



PROYECTO FINAL DE CARRERA

Sample Filtration and Archiving Instrument (SaFA)

**UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ
DEPARTAMENTO DE MECÁNICA**



**UNIVERSIDAD CARLOS III DE MADRID
DEPARTAMENTO DE AUTOMÁTICA**

AUTOR: **ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO**

TUTOR UPR: **MATTHEW SMITH**

TUTOR UC3M: **JOSE MARÍA ARMINGOL MORENO**

COORDINADOR INTERCAMBIO: **RAMÓN ZAERA POLO**

	<p>ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO</p>	
	<p>SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)</p>	



ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO

SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING
INSTRUMENT (SaFA)



ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN	7
1.1 SUMARIO	7
1.2 OBJETIVOS	8
1.2.1 EXAMINAR VARIOS MÉTODOS DE ARCHIVO Y FILTRADO DE ARN / ADN DE AGUA DULCE Y SALADA	8
1.2.2 DISEÑAR, FABRICAR Y OPTIMIZAR UN SISTEMA DE FILTRACIÓN Y ARCHIVO	9
1.2.3 EMBOTAR EL SISTEMA DE FILTRACIÓN EN UNA UNIDAD COMPACTA	12
1.2.4 FABRICAR CINCO PROTOTIPOS Y UTILIZARLOS EN AMBIENTES MARINOS Y DE AGUA DULCE	13
1.3 DESCRIPCIÓN CUALITATIVA	17
1.4 ESTADO DEL ARTE	18
1.4.1 INTRODUCCIÓN	18
1.4.2 ESP	19
1.4.3 AMG	20
1.5 CÓDIGO ABIERTO	23
1.5.1 HISTORIA	23
1.5.2 MOVIMIENTO DEL CÓDIGO ABIERTO	25
2 BASE DE ESTUDIO	27
2.1 ENTORNO ECOLÓGICO: LA PARGUERA	27
2.1.1 HISTORIA	27
2.1.2 ACTIVIDAD ECONÓMICA	28
2.1.3 BIOLUMINISCENCIA	29
2.2 <i>PYRODINIUM BAHAMENSE</i>	30
2.2.1 EL PLANCTON	30
2.2.2 EL FITOPLANCTON	32
2.2.3 DINOFLAGELADOS (<i>PYRROPHYCEAE</i>)	33
2.2.4 <i>PYRODINIUM BAHAMENSE</i>	36
3 DISEÑO DEL ARTEFACTO	41
3.1 DISEÑO HIDRÁULICO	41
3.1.1 RÍO ARRIBA	41
3.1.1 RÍO ABAJO	42
3.2 DISEÑO DE LA CARCASA	43
3.2.1 PROBLEMAS QUE AFRONTAR	43
3.2.2 POSIBLES CONFIGURACIONES	43
3.2.3 DISEÑO ELEGIDO	45
3.3 ESTRUCTURA INTERNA	50





ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO

SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING
INSTRUMENT (SaFA)



3.4	ELECTRÓNICA DE CONTROL.....	52
3.4.1	PROGRAMACIÓN DEL PLC	56
3.5	ELECTRÓNICA DE POTENCIA.....	60
3.6	COMPONENTES.....	62
3.6.1	BOMBA DE JERINGA.....	62
3.6.2	VÁLVULA ROTATIVA	63
3.6.3	FILTROS	64
3.6.4	CONECTORES	64
3.6.5	COMPONENTES DEL ESQUELETO INTERNO	65
3.6.6	PLC	66
3.6.7	BATERÍAS.....	67
3.6.8	MODEM SUBACUÁTICO.....	68
4	PRESUPUESTO.....	69
5	CONCLUSIÓN.....	71
6	BIBLIOGRAFÍA.....	72
	ANEXOS	78
1	CÁLCULO	78
1.1	CÁLCULO FUERZAS BOYANTES	78
1.2	CÁLCULO CONSUMOS ELÉCTRICOS.....	79
2	PLANOS.....	81

	<p style="text-align: center;">ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO</p> <hr/> <p style="text-align: center;">SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)</p>	
---	---	---

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplos de filtros con carcasa estilo Swinnex	8
Figura 2. Ejemplos de los componentes del sistema.	10
Figura 3. Posibles organizaciones hidráulicas.	12
Figura 4. Vista aérea de la Bahía Fosforescente, del Departamento de Ciencias marinas y La Parguera.	14
Figura 5. Imagen de los componentes del ESP.	19
Figura 6. Imagen del AMG.....	20
Figura 7. Logotipo de “Open Source”.	23
Figura 8. Mapa conceptual del software libre y de código abierto.....	25
Figura 9. Cayo Caracoles.....	28
Figura 10. Clasificación de familias por tamaños.	31
Figura 11. Distintos tipos de plancton.	31
Figura 12. Composición taxonómica del fitoplancton. Más de 4.000 especies.....	32
Figura 13. <i>Noctiluca scintillans</i>	33
Figura 14. <i>Prorocentrum</i> spp. (a, b; c, en división); <i>Protoperidinium</i> (d), <i>Gymnodinium</i> (e), <i>Dinophysis</i> (f) y <i>Gonyaulax</i> (g).	34
Figura 15. Mareas rojas o purgas de mar.....	35
Figura 16. Bioluminiscencia con respuesta a la agitación.	36
Figura 17. <i>Pyrodinium bahamense</i>	37
Figura 18. Estructura molecular de la saxitoxina.	39
Figura 19. Configuración hidráulica río arriba.	41
Figura 20. Configuración hidráulica río abajo.....	42
Figura 21. Presiones de colapso de distintos tipos de PVC.....	45
Figura 22. Dimensiones de distintos tipos de PVC.	46
Figura 23. Vista seccionada de la tapa.	47
Figura 24. Vista externa de la carcasa.	47
Figura 27, 26 y 27. Distintas vistas de la tapa.	48
Figura 28. Sellado de conectores.	49
Figura 29. Conectores.....	49
Figura 30. Esqueleto interno del SaFA.....	50
Figura 31. Bandeja para filtros.	51
Figura 32. Bandeja para filtros.	51
Figura 33. Esquema de control.	53
Figura 34. Módem subacuático.	54
Figura 35. Esquema de control con módem subacuático.	55
Figura 36. Diagrama de estados.	56
Figura 37. Esquema hidráulico definitivo.	57
Figura 38. Esquema eléctrico de potencia.	61





	<p>ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO</p>	
	<p>SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)</p>	

Figura 39. Jeringa de succión.	62
Figura 40. Válvula Rotativa y esquema resumido de sus vías.	63
Figura 41. Filtros utilizados.	64
Figura 42. Conector utilizado.	64
Figura 43. Tuercas utilizadas.	65
Figura 44. Largueros utilizados.	65
Figura 46. Certificados del FPWIN PRO.	66
Figura 45. FP0 R32 TC.	66
Figura 47. Baterías utilizadas.	67
Figura 48. Módem subacuático.	68
Figura 49. Fuerzas boyantes.	78

	ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO		
	SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)		

1 INTRODUCCIÓN



1.1 SUMARIO

La realización de este proyecto, Sample Filtration and Archiving Instrument, que en adelante será proyecto SaFA, responde a una necesidad en el mundo de la investigación biológica, no existe ningún sistema de estudio de este tipo accesible a la mayoría de los investigadores, dado que los que existen, ni responden a las necesidades de la mayoría ni son accesibles, por precio, al gran público.

Por eso se desarrolla SaFA, un proyecto con espíritu “open source”, que al igual que en el software con esta licencia, busca que todo el mundo tenga acceso y que al igual, todo el mundo aporte sus mejoras y su experiencia de uso. Toda la documentación y planos se verán colgados en internet cuando el proyecto termine.

Con ese problema se encuentra Puerto Rico, que está sufriendo la desaparición paulatina de *Pyrodinium bahamense*, un dinoflagelado que provoca que en varias de las bahías de la población costera de La Parguera, al agitar el agua, esta misma brille. La desaparición de este dinoflagelado significaría, además de una gran pérdida en el ecosistema, una disminución de ingresos abismal por turismo.

Para ello se aplicará el proyecto SaFA, que recogerá muestras genéticas de estos dinoflagelados en las bahías de La Parguera para estudiarlas e intentar averiguar el motivo de esta desaparición para intentar frenarla de alguna manera.

	ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO	
	SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)	

1.2 OBJETIVOS



1.2.1 EXAMINAR VARIOS MÉTODOS DE ARCHIVO Y FILTRADO DE ARN / ADN DE AGUA DULCE Y SALADA.

El primer objetivo será examinar la estabilidad del ADN / ARN de las células que han sido capturadas en los filtros y almacenadas, en la presencia de diferentes buffers de archivo. Estos buffers pueden incluir TrisEDTA (TE), RNAlater (Ambion), PrepProtect (Milenyi Biotec), RNASafer (SuperArray biotecnología), y otros compuestos, según corresponda. Se propone probar cada búfer mediante el filtrado de 200-500 ml de agua (dulce y marina) con filtros Durapore de 0,45 μm en carcasas (por ejemplo, Swinnex



Figura 1. Ejemplos de filtros con carcasa estilo Swinnex



(Millipore), Sterlitech etc. Como por ejemplo, la Figura 1). Un filtro será procesado inmediatamente extrayendo el ARN o ADN y que servirá como punto de referencia para la estabilidad de los ácidos nucleicos obtenidos por el método de archivo. Los filtros restantes se almacenarán a temperatura ambiente en oscuridad durante 2 semanas, se extraerá una muestra de ácidos nucleicos al día. Todo el ácido nucleico extraído se almacenará a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Después del período de dos semanas, todas las muestras se amplificarán por PCR utilizando cebadores específicos de las bacterias para ARISA (Fisher y Triplett, 1999; Jones et al, 2007). Las huellas ARISA de cada muestra tomada durante el período de 2 semanas se compararán con la muestra de la hora cero mediante el cálculo de índices de similitud de pares de Bray-Curtis (Legendre y Legendre, 1998) con la altura del pico. Una disminución similar en Bray-Curtis indicaría una disminución de la integridad del ácido nucleico en el tiempo. Vamos a seleccionar los tres mejores buffers para repetir el examen anterior pero utilizando muestras por triplicado. Además vamos a realizar experimentos con tiempo de almacenamiento prolongado, recogiendo 3 muestras cada semana durante 4 semanas.

	<p>ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO</p>	
	<p>SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)</p>	

Se espera que el instrumento SAFA tenga una amplia aplicación tanto en estudios oceanográficos como limnológicos, se van a realizar los experimentos de archivo en los dos ambientes, marinos y de agua dulce. Las muestras de los hábitats marinos se extraerán y se amplificarán por PCR en el laboratorio de Smith en el Departamento de Ciencias Marinas de la Universidad de Puerto Rico, usando las aguas costeras obtenidas en una bahía bioluminiscente cerca de La Parguera, Puerto Rico. Las muestras de agua dulce serán procesadas por el Laboratorio de McMahon en el Departamento de Ingeniería Civil y Ambiental de la Universidad de Wisconsin - Madison con agua obtenida en el Lago Mendota, en el marco de proyectos de investigación en curso (Career Award y el Observatorio Microbiano). Las amplificaciones PCR generadas en ambos laboratorios serán separados por electroforesis capilar en un analizador genético ABI 3730 (PE Biosystems) del Centro de Biotecnología de la Universidad de Wisconsin. Los perfiles resultantes se analizarán usando el software GeneMarker V. 1.5 (SoftGenetics LLC) y un script desarrollado en el paquete estadístico R (R Development Team, 2008) para ayudar a "hurgar en la basura" de los picos (Jones et al., 2008 en prensa).

1.2.2 DISEÑAR, FABRICAR Y OPTIMIZAR UN SISTEMA DE FILTRACIÓN Y ARCHIVO.

Para este objetivo, diferentes componentes de hardware serán seleccionados con un análisis de costo / beneficio realizado, como bombas, válvulas y componentes electrónicos. La energía, el costo, y todos los cálculos se abordarán mediante la adopción del sistema en paquete (SiP) con enfoque de diseño (Beal y Sherman, 2000; Brown, 2004). SiP ofrece un enfoque de diseño flexible y es la estrategia a seguir para la miniaturización de los teléfonos móviles, ordenadores portátiles, es lógico que el paradigma se extendiera al desarrollo de la SAFA. Proponemos el uso de una bomba de jeringa para el muestreo de agua, ya que permiten un muestreo más preciso y administrar mejor los volúmenes, en comparación con los sistemas que requieren un medidor de flujo (Fig. 2A). Una serie de fabricantes ofrecen bombas de jeringa OEM que son capaces de aceptar diferentes tamaños de jeringas desechables. Una característica adicional de estas bombas es su capacidad para ser equipadas con protección de bloqueo que impide a la bomba trabajar si la contrapresión es demasiado grande (es decir, a través de la obstrucción de los filtros). Esta situación preservará el sistema de prevención de daños en la bomba, y ayudará a evitar las fugas por un exceso de presión en las conexiones de fluidos.

	ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO	
	SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)	

También proponemos el uso de la tecnología existente de válvula rotativa para permitir flujos de muestra que se dirige a su filtro adecuado (Fig. 4B, C). El uso de la tecnología de válvula rotativa proporciona un embalaje eficiente del conjunto de la válvula y por lo tanto se reducirá la huella de instrumentos en general. Del mismo modo, válvulas rotativas han sido ampliamente adoptados en GC y HPLC instrumentos de laboratorio basado en el que han demostrado ser una tecnología de ciclo de vida fiable y de alta.

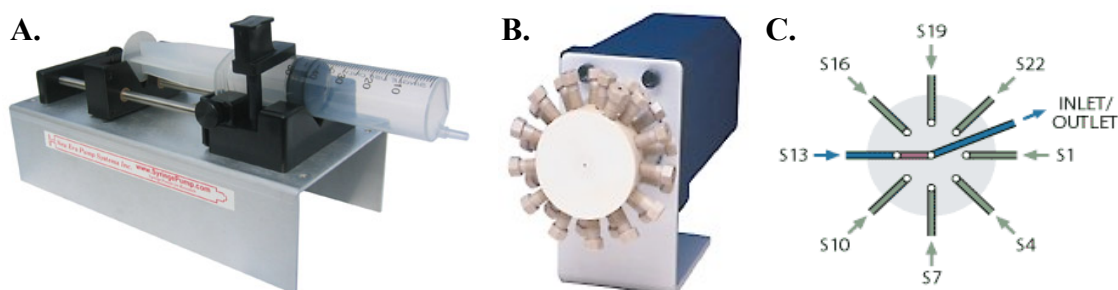




Figura 2. Ejemplos de los componentes del sistema.

- A) Ejemplo de una bomba de jeringa OEM.
- B) Ejemplo de una válvula rotativa electrónica Cheminert® modelo C35Z.
- C) Representación esquemática de la válvula rotativa mostrando 8 de los 24 canales.

Una vez seleccionados los mejores componentes del sistema (sobre la base de nuestro análisis costo / beneficio), **se construirá un sistema de filtración de laboratorio basado en examinar la eficiencia de bombeo y diferentes configuraciones hidráulicas.** Optimizar la eficiencia de filtración automática es una tarea sumamente importante y servirá como base para el cálculo de los requerimientos de energía global del instrumento y por lo tanto las necesidades de la batería (y las todos de instrumentos en general). Ya que la bomba que se requiere para mover el agua desde el medio ambiente a través de un filtro de membrana y de nuevo al medio ambiente será la principal fuente de consumo de energía. Uno de nuestros principales objetivos será el de examinar los diseños de fluidos para minimizar el número de bombas eficientemente y conseguir un rápido filtrado de 200 a 500 ml de agua y dispensar el buffer de archivo. Dos ejemplos potenciales de la estructura organizativa de fluidos se muestran en la Figura 3. Se propuso el uso de un diseño de sistema cerrado que sea capaz de generar una presión moderada para facilitar la filtración. Para ello se hará uso de la compresión, sujetado o con accesorios tipo Luer-lock accesorios

	<p>ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO</p>	
	<p>SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)</p>	

en todas las conexiones de fluidos.

Eficacia de la filtración se evaluó inicialmente en el laboratorio mediante el examen de la hora y la energía requerida para mover 500 ml de agua del grifo y auténtico muestras de aguas superficiales con diferentes configuraciones de bombeo de fluidos. La configuración que tiene el menor consumo de energía y es capaz de filtrar 500 ml de agua en menos de 10 minutos se emplearán. Vamos a examinar el uso de diferentes tamaños de poros de filtros y filtros de pre-que permiten el movimiento de fluido eficiente sin comprometer la eficiencia de captura. Para minimizar la contaminación biológica y la contaminación cruzada que se utilizan tubos de teflón en todo el instrumento. Smith ha utilizado previamente la tubería de teflón en el desarrollo del sistema de AMG, con buenos resultados. Al igual que en el AMG, pondremos en marcha un ciclo de purga dentro del instrumento, para limpiar el sistema con una pequeña cantidad de agua a temperatura ambiente antes de la filtración se produce (Fig. 5). Esto se ha demostrado para limpiar las líneas tanto de agua residual del ciclo de muestreo anterior y el tampón residual (s). Como las válvulas y las bombas tienen un volumen muerto inherentes asociados con ellos, vamos a evaluar y la dirección (en el diseño de fluidos) el potencial de contaminación entre las corridas. Para lograr esto vamos a correr el agua de mar estéril y secuencial de muestras de agua desionizada (DI), y la pantalla utilizando la PCR cuantitativa para evaluar la contaminación. ADN se extrae de los filtros de DI y 16S rRNA genes bacterianos se amplifica mediante un ensayo de PCR en tiempo real de uso habitual en el Laboratorio de McMahon (He et al., 2007). Esto nos permitirá determinar aproximadamente la extensión de la contaminación cruzada, en su caso.

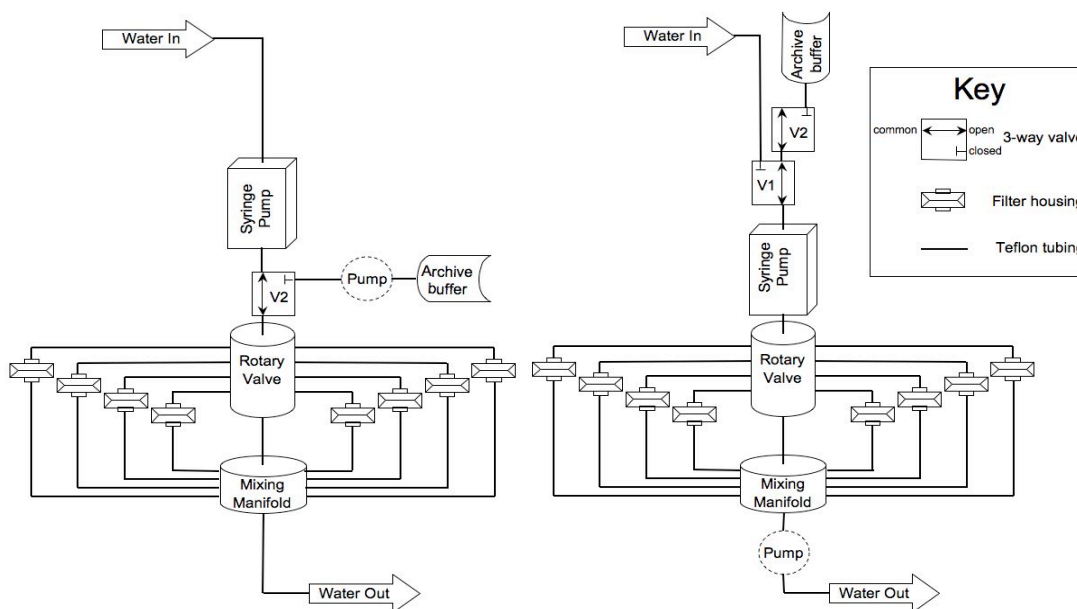




Figura 3. Posibles organizaciones hidráulicas.

Se muestran los principales componentes del sistema y solo 8 de los flujos totales.

Como parte de este objetivo, también se incluye el prototipo de la electrónica de control y su software para ejecutar y programar el sistema. Una serie de subsistemas electrónicos diferentes tendrá que ser incorporados, un sistema de gestión de energía para regular la alimentación de los componentes del sistema, un reloj de tiempo real para los eventos de muestreo (comienzo y fin), y los elementos de control asociados a la válvula y a la bomba. Para alimentar el instrumento, se utilizará una batería militar con tecnología a base de litio (como el Ultralife Inc, UBI-2590), que ofrece la ventaja de ser ligero y tener una alta densidad de energía. Para ayudar a minimizar los requerimientos de energía del sistema, se incluirá como objetivo el uso de componentes electrónicos de bajo consumo.

1.2.3 EMBOTAR EL SISTEMA DE FILTRACIÓN EN UNA UNIDAD COMPACTA

Para este objetivo vamos a construir un prototipo con un sistema de control electrónico y una caja de cierre hermético. En primer lugar, se fabricará y optimizará un sistema de control que deberá ocupar lo menos posible.



	ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO	
	SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)	

La carcasa a diseñar debe ser evaluada a una alta presión externa, a 200 m de profundidad, que debería permitir su uso en muchas aplicaciones costeras o de agua dulce.

Tras la finalización del modelo vamos a construir un prototipo de instrumento para la depuración y solución de los problemas objetivo. Los ensayos de laboratorio basados en la filtración se llevarán a cabo para asegurar su correcto funcionamiento. Tras la operación de laboratorio se someterá a una serie de pruebas en agua desde el muelle en el Departamento de Ciencias Marinas (DMS), del RUM. Con la intención de detectar y abordar los mayores fallos de diseño, mediante la modificación de los paquetes de dibujo CAD. Del mismo modo, si es necesario se va a poder hacer frente a cualquier defecto de diseño en el circuito hidráulico fluidos o en la electrónica de control. Una estimación conservadora de las dimensiones de SaFA es de aproximadamente 0,5 m de largo y 20,5 cm de diámetro.

1.2.4 FABRICACAR CINCO PROTOTIPOS Y UTILIZARLOS EN AMBIENTES MARINOS Y DE AGUA DULCE.

Después de la depuración del instrumento desarrollado en el objetivo 3, se van a construir 4 instrumentos adicionales. Si es necesario, se adaptará el instrumento desarrollado en el objetivo anterior para incluir todas las actualizaciones. De los cinco instrumentos desarrollados 2 será enviados al laboratorio de McMahon de la Universidad de Wisconsin, Madison (UW-M), y 2 se mantendrán en el Laboratorio de Smith en el RUM. El instrumento restante servirá como un instrumento de laboratorio en el RUM para el desarrollo de aplicaciones adicionales (como la integración de otros sensores), además de servir como respaldo en caso de que se dañen o pierdan los demás. Los inhibidores de proteasa de Smith, McMahon, y Schmidt demostrarán la utilidad del sistema SaFA para aplicaciones oceanográficas y limnológicas mediante la realización de muestreos de alta resolución en estudios de sistemas marinos y de agua dulce. Las muestras serán procesadas con la técnica de huellas dactilares del ácido nucleico ARISA para examinar la dinámica de la comunidad microbiana de los respectivos entornos. Todos los investigadores involucrados en el desarrollo de los ecosistemas acuáticos in situ (marinos y limnológicos), sensores biológicos o los sistemas de observación se enfrentan a obstáculos similares. Esta propuesta ofrece una oportunidad única para intercambiar ideas y experiencias entre los diferentes biológicamente (oceanografía física y biológica y la limnología), pero al fin y al cabo campos de investigación afines.

	ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO	
	SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)	



Para **aplicaciones marinas**, Smith y Schmidt van a realizar pruebas de campo y a optimizar la SAFA en la bahía bioluminiscente (localmente conocida como Bahía Fosforescente) cerca de La Parguera, Puerto Rico (Figura 4). La Bahía Fosforescente tiene una población aproximadamente constante durante todo el año de los dinoflagelados





Figura 4. Vista aérea de la Bahía Fosforescente, del Departamento de Ciencias marinas y La Parguera.

bioluminiscentes *Pyrodinium bahamense* (Seliger et al., 1971). A nivel local, la bahía es una importante fuente de ingresos a través del turismo, sin embargo, indicaciones de los residentes locales y de los operadores turísticos sugieren que la bioluminiscencia de la bahía se ha ido reduciendo en los últimos años. Algunos trabajos se han

realizado en las poblaciones de dinoflagelados y la oceanografía física de la bahía (Seliger et al., 1971). Sin embargo, poco trabajo de biología molecular se ha realizado en las poblaciones microbianas y los factores físicos que pueden configurar su estructura. Proponemos un lugar de estudio con el SAFA en la boca de la bahía y otro en la parte trasera. Dependiendo de la configuración final de la SAFA, los instrumentos se pueden programar para recoger entre 2 a 3 muestras por día durante 10 días. Para examinar los parámetros físico-químicos de la bahía, vamos a realizar cortes transversales al día durante 10 días con una sonda YSI, con las muestras para el análisis ARISA recogidas de forma manual. Vamos a buscar tendencias y correlacionar la estructura y la dinámica de la comunidad basado en su análisis ARISA con las propiedades físicas / químicas medidas por la sonda YSI utilizando el análisis de la correspondencia, como comúnmente se llevó a cabo en el Laboratorio de McMahon (Kent et al, 2007;. Jones et al, 2008a;. sombra et al, 2008). Estos resultados serán de gran valor para formar los datos preliminares para futuras propuestas para la caracterización física, química y biológica del ecosistema que podría cambiar en un futuro.

	ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO	
	SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)	

En **agua dulce**, McMahon tiene gran experiencia en el estudio de la dinámica de la comunidad bacteriana en escalas de tiempo de días (Kent et al, 2007;. Jones et al, 2008a;.. Sombra et al, 2008) y tiene varios proyectos en marcha para controlar la respuesta de la estructura de la comunidad a corto plazo, que incluyen las perturbaciones lago de mezcla (financiado por los Observatorios microbianos NSF 0702395) y la carga de fósforo (financiado por la NSF CARRERA 0.644.949). Los dos prototipos de dispositivos se utilizan en estos proyectos que permitan la recogida de muestras en una resolución más alta (por ejemplo, dos veces al día) que sería factible con el muestreo manual convencional. Ambos sistemas de estudio (en la Sierra Norte Distrito de los Lagos de Wisconsin y el lago Mendota, respectivamente) son sitios GLEON equipado con instrumental boyas (ver también el impacto más amplio e instalaciones). Estas boyas sensores de apoyo que la medida estándar de parámetros limnológicos como la temperatura, oxígeno disuelto, clorofila-a, pH, conductividad, potencial de oxidación y reducción, y las variables meteorológicas en escalas de tiempo de minutos (Figura 5). Los datos se transfieren por medio de radios de espectro disperso digital y cargados en una base de datos por hora puede accederse por Internet. El sistema SaFA se instalará en estas boyas y telemetría programados para activar a distancia por los usuarios. Esto se puede realizar mediante un mecanismo de disparo digital, basado en que está presente en un puerto de salida digital incluido en muchos disponibles en el mercado de datos de los registradores y controladores (por ejemplo, Campbell Scientific, NexSens, etc.). Además, el dispositivo puede ser activado de forma automática por los eventos detectados por los instrumentos adicionales en la boya (o dentro de la red de boyas). Por ejemplo, una floración de algas detectadas in-situ o la ruptura de la estratificación térmica en un lago detectado por una cadena de termistores podrían desencadenar muestreo. Tener esta conexión con el sistema de registro de datos y telemetría tendría la ventaja de poder notificar al usuario de los eventos de muestreo y cuando el sensor ha agotado su fuente de filtro. Las muestras se recogerán durante los períodos de rápido cambio en las condiciones ambientales, como por ejemplo durante las tormentas (cuando es demasiado peligroso para recoger manualmente las muestras) y las floraciones de cianobacterias. Tanto estos hechos comprendidos en el ámbito del cambio perturbación mediado en las comunidades bacterianas relacionadas con forzamientos externos e internos, respectivamente, que es el tema del curso McMahon. Vamos a utilizar el programa SaFA para recoger muestras de bacterias de la comunidad en cada hora a escalas de tiempo diario para su posterior análisis por ARISA. Herramientas de análisis multivariante se utilizan para relacionar el cambio de la comunidad para boya instrumentada datos (Jones et al, 2008a;. Sombra et al, 2008).

	ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO	
	SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)	



El impacto más amplio: Ámbito de uso potencial

Esperamos que los instrumentos SaFA tengan una aplicación de amplia escala en los estudios limnológicos de microbiana marina, al permitir que las muestras de alta resolución se extraigan a intervalos específicos, algunos de los cuales pueden ser imposibles de capturar manualmente debido a preocupaciones de seguridad y accesibilidad. El instrumento también podría ser utilizado para otras aplicaciones que no sean moleculares como estudios microbiológicos, mediante la alteración de la composición del filtro, lo que es útil en disciplinas que van de los eventos de la biología pesquera y la coral de desove, oceanografía química, o toma de muestras atmosféricas.

Para maximizar el acceso al instrumento a la comunidad científica en general, se sigue el ejemplo del software de código abierto, por lo que todos los esquemas de ingeniería (eléctrica y mecánica), software, materiales necesarios (incluidos los números de pieza del fabricante y el costo aproximado) serán de libre acceso y descargables a través de la página web GLEON ([http:// www.gleon.org/](http://www.gleon.org/)). En los archivos se proporcionarán todos los detalles necesarios para la construcción y operación de un sistema SaFA. Los detalles se encontrarán en la URL y serán publicados en la literatura científica y puestos a disposición del público a través de presentaciones en congresos científicos. Como parte de la página web también se estudiará la creación de un estilo de foro en la web-log, donde los usuarios (o potenciales usuarios) del instrumento puedan publicar detalles de las aplicaciones nuevas o modificaciones hechas al instrumento para mejorar su funcionalidad. Este foro por lo tanto, proporcionará una vía para el desarrollo y la mejora continua del instrumento SaFA.

Otros impactos amplios: Educación y Recursos Humanos

Para aumentar el valor social de la investigación propuesta, existe la intención de llegar a los pre-universitarios y universitarios, tanto en Puerto Rico como en Madison, Wisconsin, así como al público en general, a través de un conjunto coordinado de actividades educativas.

	ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO	
	SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)	

1.3 DESCRIPCIÓN CUALITATIVA

Actualmente, los sistemas autónomos que pueden hacer mediciones moleculares quedan fuera del alcance de la mayoría de los investigadores acuáticos, debido a su inherente complejidad operativa, altos costes de funcionamiento, capacidad de análisis limitado y carácter reservado. Por lo tanto hay pocas probabilidades de que estos sistemas sean ampliamente adoptados por la mayoría de los investigadores. Sin embargo, los micro-ecólogos marinos necesitan urgentemente plataformas autónomas que sean capaces de tomar muestras ambientales de agua y almacenarlas para su posterior análisis biológico molecular.



Para solucionar este problema, se ha diseñado un pequeño dispositivo autónomo que permitirá un aumento en el régimen de recogida de muestras de agua in situ.

El sistema de filtrado y archive de muestras (Sample Filtration and Archiving, SAFA) ha sido diseñado para recoger y filtrar 24 muestras de agua de entre ~ 200-500 ml con fecha y hora definidas por el usuario.

Los filtros se estabilizan con un líquido buffer de conservación de ADN, así se podrán recuperar sin pérdida de información y estarán disponibles para el procesado posterior en el laboratorio.

El proyecto SAFA se ha desarrollado para ser utilizado en las aguas costeras de Puerto Rico, donde se ha demostrado que se pueden estabilizar las muestras para un máximo de 3 días sin degradación del ADN apreciable. El sistema permitirá un aumento en los regímenes de muestreo in situ, sin necesidad de personal desplegado en el campo, especialmente en periodos peligrosos o inconvenientes. Así también, nos aseguramos de que el personal, no contamina con su presencia el medio a estudiar.

Para facilitar su adopción por los usuarios finales, el proyecto SAFA se construye con piezas fácilmente disponibles en el mercado, y toda la información relativa a su construcción y operación se podrá descargar bajo una licencia de código abierto. Ésta naturaleza de código abierto del proyecto SAFA permitirá a los usuarios finales desarrollar el instrumento, evolucionando a medida que los usuarios proporcionen información sobre los nuevos diseños o aplicaciones.

	<p style="text-align: center;">ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO</p> <hr/> <p style="text-align: center;">SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)</p>	
---	---	---



1.4 ESTADO DEL ARTE

1.4.1 INTRODUCCIÓN

Se necesita con urgencia el desarrollo de sistemas de observación acuáticos que incluyan la capacidad de controlar los fenómenos biológicos. La mayoría de los analizadores de bio-situ se encuentran actualmente en diversas etapas de investigación y desarrollo. En la actualidad, los instrumentos más utilizados y por lo tanto, avanzados, para la detección biológica en el medio ambiente se basan en la detección óptica. Por ejemplo, sensores ópticos in situ que miden pigmento (por ejemplo, la clorofila, ficocianina, ficoeritrina), la medición de las concentraciones a través de espectros de fluorescencia ya están disponibles comercialmente (por ejemplo, YSI, laboratorios húmedos, etc) y son comunes en las ciencias acuáticas (Paul et al. 2007). Una serie de sensores de tecnologías emergentes que combinan la citometría de flujo o espectrometría para analizar las características ópticas de las muestras de agua a granel o para identificar o enumerar las partículas que pasan a través de un detector en particular. Ejemplos de estas tecnologías:

1. El FlowCam, es el único instrumento disponible comercialmente (tecnologías de fluidos de imágenes) que combinan las imágenes de fito-zoo-plancton adquiridas con los directores de la citometría de flujo y las adquiridas con el microscopio.
2. Sipper (desarrollado en la Universidad del Sur de Florida (Remsen et al, 2004).) Imágenes de zooplancton con los directores de la citometría de flujo, detectados usando una cámara de escaneo en línea.
3. FlowCytobot, un citómetro de flujo bajo el agua desarrollados en el WHOI (Olson et al, 2003) ha dado seguimiento a las poblaciones de picoplancton in situ.
4. BrevBuster, desarrollado en los Laboratorios Mote Marine detecta la presencia de floraciones de *Karenia brevis* (la marea roja formada por dinoflagelados) mediante el análisis de la absorción y el cálculo de un índice de similitud, características de *K. brevis* (Robbins et al., 2006).

Aunque estas técnicas ópticas son relativamente maduras y cada vez son más habituales en las ciencias acuáticas, carecen de la capacidad de distinguir los grupos

	ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO	
	SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)	

microbianos (por ejemplo, a nivel de especie o superior), y con excepción de la FlowCam, no son fácilmente accesibles a la comunidad científica.

La incorporación de técnicas de biología molecular en los sensores marinos in situ es un objetivo actual, ya que ofrecen la detección sensible, enumeración e identificación de los microbios. A nuestro entender, sólo dos sistemas in situ que emplean el análisis genético se han aplicado a las ciencias acuáticas. Ambos sistemas comparten atributos comunes, tales como: robótica, como las operaciones mecánicas, y el uso de bombas de jeringa de agua. Sin embargo, los dos sistemas difieren en su funcionamiento, capacidades y técnicas genéticas empleadas.

1.4.2 ESP

El sistema más desarrollado y robusto, el procesador de muestras ambientales (ESP), está siendo desarrollado por Chris Scholin y sus compañeros de trabajo en MBARI (www.mbari.org/microbial/esp). El ESP realiza una serie de análisis molecular in situ, basados en la costumbre de reacción molecular realizado mediante técnicas de hibridación en matrices de sándwich sonda impresa en filtros de nitrocelulosa reforzada. El ESP ha sido aplicado con éxito en el medio marino para detectar *Pseudonitzschia australis* (Greenfield et al., 2006), y larvas de invertebrados como *Carcinus maenas*, *Mytilus* sp. *Balanus* sp. y los poliquetos especies de *Osedax*

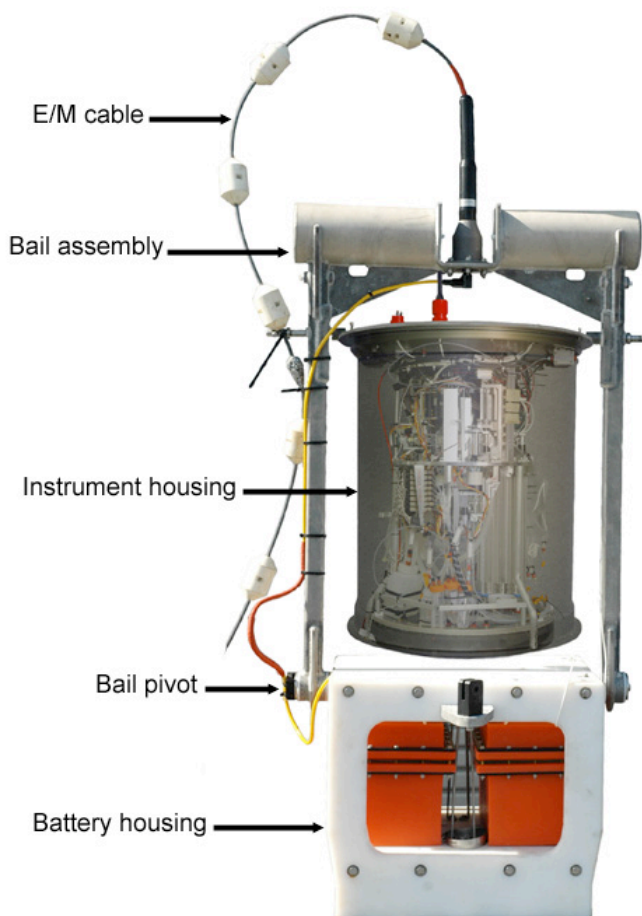
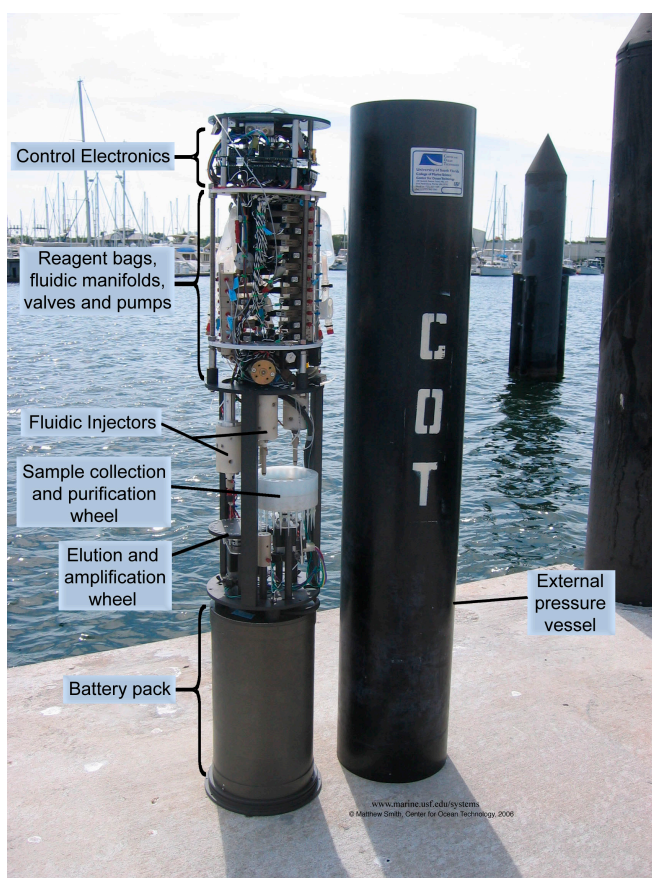


Figura 5. Imagen de los componentes del ESP.

sp. y Ofelia sp. (Jones et al., 2008). El ESP es capaz de integrar el laboratorio de muestras de archivo y aguas abajo a través del almacenamiento de los discos de filtración. Mientras que el ESP se ha desplegado durante períodos prolongados con éxito, su tamaño y peso (Fig. 5), así como el alto grado de piezas personalizadas y su alto precio lo ponen fuera del alcance del investigador promedio.



1.4.3 AMG

La segunda plataforma de sensores biológicos, el Genosensor microbiano Autónomo (AMG) (Fig. 6) está siendo desarrollado por la Universidad de la universidad de Florida del Sur de Ciencias Marinas ([http:// www.marine.usf.edu/systems/?q=amg](http://www.marine.usf.edu/systems/?q=amg)). El AMG es la primera boya de detección microbiológica que es diseñado basado en la amplificación de ácidos nucleicos (Amplificación nucleicos basada en la secuencia de ácido - NASBA). La operación central de la AMG reside en cada proceso (30 ml) muestras de



agua de forma secuencial a través de la interacción de compensación 2 ruedas giratorias. La primera rueda contiene filtro de ARN personalizado en columnas de purificación y es responsable de la concentración de la muestra, la lisis celular, purificación de ARN y la sub-muestra de ARN diluido. La segunda rueda contiene 200 µl tubos de PCR que contienen el ácido nucleico diluido y tiendas de liofilizado químico amplificado antes de su uso. Además, esta rueda interactúa con un fluorómetro climatizado que lleva a cabo y detecta la amplificación del ARN. En la actualidad, la capacidad del AMG limita el número de muestras que pueden ser procesados a 12, incluyendo cuatro controles negativos que comprobar la contaminación del sistema.



Figura 6. Imagen del AMG

	<p>ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO</p>	
	<p>SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)</p>	

El profesor Smith ha estado involucrada en el proyecto AMG desde su creación en 2002 y ha impulsado el desarrollo del instrumento desde principios biológicos de preparación de muestras y técnicas de amplificación NASBA, a la creación de la automatización, operación mecánica y envasado de la instrumento. En principio, el AMG se puede adaptar a muchos objetivos microbianos diferentes, cambiando la cartilla / sonda y los protocolos de lisis celular. Está configurado actualmente para detectar *Karenia brevis*. Un trabajo reciente de los inhibidores de la proteasa Smith y McMahon (NSF SGER DBI-0639044) está extendiendo su aplicación para incorporar un análisis para detectar la *Microcystis* sp. en agua dulce por objetivo transcripciones del gen *mcyB*, que participa en la producción de la toxina microcistina de cianobacterias.

El AMG es de aproximadamente 1,5 m de alto y 20,5 cm de diámetro y pesa aproximadamente 40 kg. Por lo tanto, en comparación con el ESP, es más accesible para el despliegue en pequeñas embarcaciones con un número limitado de personal. Sin embargo, su diseño general y la configuración actual tiene una serie de limitaciones inherentes que impiden su aplicación generalizada, incluyendo: dificultad de calibración y configuración para su implementación, ya que contiene una serie de piezas personalizadas que no están disponibles (por ejemplo, la química NASBA), o que requieren que el usuario para la fabricación de ellos (por ejemplo, la filtración de la muestra y columnas de extracción), sellado y la estabilidad del liofilizado química NASBA, y problemas mecánicos de alineación entre las partes robóticas (por ejemplo, inyección y alineación de las ruedas). Por último, ya que todos los líquidos procesados por la AMG, que actualmente se encuentran reclusos en la unidad, que se limita a tomar pequeños volúmenes de muestra. Tomamos nota de que el AMG ha pasado de los primeros principios de sensor prototipo en fase de ensayo de campo en sólo 6 años (2 de los 6 años han sido de campo basado en la optimización y de laboratorio). Se ha avanzado mucho en hacer frente a algunos de los problemas antes mencionados (y otros). Sin embargo, muchas limitaciones aún deben ser superadas, y hasta la fecha sólo un puñado de despliegues han podido producir resultados legítimos.

Esta propuesta tiene como objetivo desarrollar un instrumento "código abierto" que permita un muestreo de campo de material biológico, de archivo y posterior análisis de las muestras con una infraestructura y técnicas de laboratorio establecidas. Proponemos abordar las limitaciones observadas en la configuración de AMG mediante el desarrollo de un sistema cerrado, la presión moderada, de fluidos / dispositivo de filtración. Además, el uso de la tecnología de válvula rotativa eliminará la

	<p>ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO</p>	
	<p>SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)</p>	

mecánica "robótica" como características que se utilizan tanto en la AMG y el ESP y moverlo hacia un enfoque más novedoso de diseño de estado sólido. Esto no sólo aumentará la solidez de la operación de instrumentos en el campo, sino también a disminuir el tamaño total del instrumento, el peso y el consumo energético. Además, todas las especificaciones técnicas estarán disponibles al público, tales, que el instrumento puede ser copiado y fabricados por otros investigadores. Para facilitar la fabricación de instrumentos (externos al RUM y UWM) se hará hincapié en el uso de piezas que están fácilmente disponibles en el mercado. Aunque este dispositivo no tiene la capacidad de centinela de vigilancia en tiempo real que las nuevas tecnología in situ sensor biológico, representa un primer paso fundamental hacia un sistema verdaderamente viable y sólido para la investigación en medios acuáticos de ecología microbiana.

	ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO	
	SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)	

1.5 CÓDIGO ABIERTO

Se menciona varias veces a lo largo de este trabajo, que el proyecto tiene un espíritu “open source”, por lo tanto, a continuación se dan varias pinceladas de lo que esto significa.





Figura 7. Logotipo de “Open Source”.

Código abierto o “open source” es el término con el que se conoce al software distribuido y desarrollado libremente. El código abierto tiene un punto de vista más orientado a los beneficios prácticos de compartir el código que a las cuestiones morales y/o filosóficas las cuales destacan en el llamado software libre.

1.5.1 HISTORIA

Su uso nació por primera vez en 1998 de la mano de algunos usuarios de la comunidad del software libre, tratando de usarlo como reemplazo al ambiguo nombre original en inglés del software libre (*free software*). *Free* en inglés significa dos cosas distintas dependiendo del contexto: gratuidad y libertad. Lo cual implica, para el caso que nos ocupa, “software que podemos leer, modificar y redistribuir gratuitamente” (software gratuito) y, además, software libre, según la acepción española de libertad.

El término para algunos no resultó apropiado como reemplazo para el ya tradicional *free software*, pues eliminaba la idea de *libertad*, confundida usualmente con la simple *gratuidad*. No obstante, el término *código abierto* continúa siendo ambivalente, puesto que se usa en la actualidad por parte de programadores que no ofrecen software libre pero, en cambio, sí ofrecen el código fuente de los programas para su revisión o modificación *previamente autorizada* por parte de sus pares académicos.

	ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO	
	SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)	

Dada la anterior ambivalencia, se prefiere el uso del término *software libre* para referirse a programas que se ofrecen con total libertad de modificación, uso y distribución bajo la regla implícita de no modificar dichas libertades hacia el futuro.

Desde el punto de vista de una "traducción estrictamente literal", el significado textual de "código abierto" es que "se puede examinar el código fuente", por lo que puede ser interpretado como un término más débil y flexible que el del *software libre*. Sin embargo, ambos movimientos reconocen el mismo conjunto de licencias y mantienen principios equivalentes.

Sin embargo, hay que diferenciar los programas de *código abierto*, que dan a los usuarios la libertad de mejorarlos, de los programas que simplemente tienen el código fuente disponible, previa restricciones sobre su uso o modificación.

Un término que pretende resolver posibles ambigüedades o confusiones que ambos términos generan es FOSS (*free and open source software*).

En la actualidad el código abierto se utiliza para definir un movimiento nuevo de software (la Iniciativa "Open Source"), diferente al movimiento del software libre, incompatible con este último desde el punto de vista filosófico, y completamente equivalente desde el punto de vista práctico, de hecho, ambos movimientos trabajan juntos en el desarrollo práctico de proyectos.

La idea bajo el concepto de código abierto es sencilla: cuando los programadores (en Internet) pueden leer, modificar y redistribuir el código fuente de un programa, éste evoluciona, se desarrolla y mejora. Los usuarios lo adaptan a sus necesidades, corrigen sus errores a una velocidad impresionante, mayor a la aplicada en el desarrollo de software convencional o cerrado, dando como resultado la producción de un mejor software.

1.5.2 MOVIMIENTO DEL CÓDIGO ABIERTO

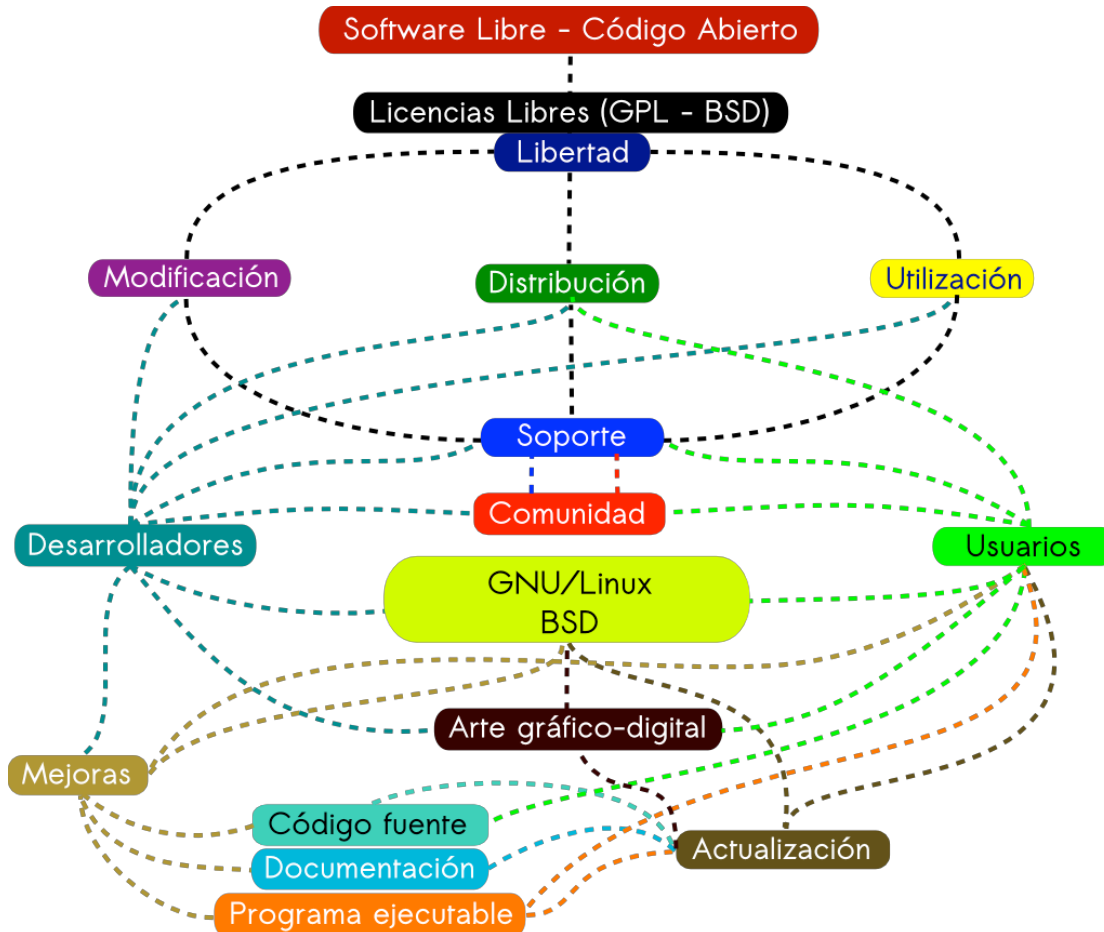




Figura 8. Mapa conceptual del software libre y de código abierto.



La idea del código abierto se centra en la premisa de que al compartir el código, el programa resultante tiende a ser de calidad superior al software propietario, es una visión técnica. Por otro lado, el software libre tiene tendencias filosóficas e incluso morales: el software propietario, al no poder compartirse, es "*antiético*" dado que prohibir compartir entre seres humanos va en contra del sentido común.

	ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO	
	SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)	

Al igual que el software libre, el código abierto u “*open source*” tiene una serie de requisitos² necesarios para que un programa pueda considerarse dentro de este movimiento, éstos son:

- Libre redistribución: el software debe poder ser regalado o vendido libremente.
- Código fuente: el código fuente debe estar incluido u obtenerse libremente.
- Trabajos derivados: la redistribución de modificaciones debe estar permitida.
- Integridad del código fuente del autor: las licencias pueden requerir que las modificaciones sean redistribuidas sólo como parches.
- Sin discriminación de personas o grupos: nadie puede dejarse fuera.
- Sin discriminación de áreas de iniciativa: los usuarios comerciales no pueden ser excluidos.
- Distribución de la licencia: deben aplicarse los mismos derechos a todo el que reciba el programa.
- La licencia no debe ser específica de un producto: el programa no puede licenciarse solo como parte de una distribución mayor.
- La licencia no debe restringir otro software: la licencia no puede obligar a que algún otro software que sea distribuido con el software abierto deba también ser de código abierto.
- La licencia debe ser tecnológicamente neutral: no debe requerirse la aceptación de la licencia por medio de un acceso por clic de ratón o de otra forma específica del medio de soporte del software.

Este decálogo es compatible con las cuatro libertades del software libre.

	ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO	
	SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)	

2 BASE DE ESTUDIO

2.1 ENTORNO ECOLÓGICO: LA PARGUERA



La Parguera es una comunidad costera y barrio del municipio de Lajas ubicado al suroeste de Puerto Rico. Este lugar se le conoce como “La Parguera” por la abundancia y buena pesca de pargos.

2.1.1 HISTORIA

Se fundó aproximadamente en 1825, cuando personas de Lajas y Cabo Rojo alentados por la aventura y el deseo de mejoras económicas se mudaron al litoral y construyeron definitivamente sus hogares. Lo que más atrajo a estos primeros pobladores fue la abundancia de la pesca, las condiciones saludables del clima y las bellezas naturales del litoral. Los pobladores se dedicaron principalmente a la pesca, siembra de maíz y a la crianza de ganado vacuno y caballar. La pesca fue la actividad económica que dio auge al progreso del poblado en sus comienzos.

Los primeros pobladores levantaron sus primeras casas en las lomas frente al mar. Al comienzo se situaron en La Parguera alrededor de 10 familias. Cuando el pueblo de Lajas se separó del municipio de San Germán en 1883 La Parguera pasó a ser uno de los 11 barrios del municipio de Lajas. A través de los años se establecieron más hogares, cuyas familias dependían mayormente de la pesca como fuente principal de ingreso. Se mantiene en La Parguera una villa pesquera que sirve como fuente de ingresos de algunas familias que habitan en el litoral.

Cuando la pesca empezó a escasear los habitantes de La Parguera se dedicaron a la construcción de pequeñas casas para la venta y alquiler a turistas que se acercaban al área. El censo de 2000 reporta una población fija de 1141 personas, la mayoría descendientes de los primeros pobladores. No obstante la comunidad de La Parguera aumenta notablemente su población durante los fines de semana especialmente durante la semana santa, el verano y fin de año. El aumento de las viviendas ha sido significativo, para 1968 existían alrededor de 250 viviendas y para el 2000 se reportan 597.

	ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO	
	SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)	

2.1.2 ACTIVIDAD ECONÓMICA



El poblado de La Parguera fue evolucionando paulatinamente de villa de pescadores a uno de los más frecuentados centros recreativos de Puerto Rico. Las principales actividades de turismo son paseos en bote a los cayos, por los canales de mangle, la pesca deportiva de dorado, wahoo, atún y pargos, buceo con tanques y kayaking entre otros.

El actual poblado de La Parguera tiene tres constituyentes arquitectónicos y socio-económicos diferentes. El primero es conocido como Las Parcelas y está constituido por las antiguas casas de los pescadores. El segundo es Las Casetas o casas en pilotes de orilla las cuales mayormente son usadas como vivienda durante fines de semana o de vacaciones. El tercer constituyente es conocido como Las Colinas y está localizada al oeste de la primera. Se caracteriza por tener construcciones más grandes y elaboradas, utilizadas como viviendas permanentes o para uso durante los fines de semana. Esta área inicia su desarrollo a finales de la década de los 80, constituyéndose actualmente en un exclusivo sector de vivienda en Puerto Rico.



Figura 9. Cayo Caracoles.



La actividad comercial en La Parguera gira en torno a la pesca comercial y establecimientos comerciales relacionados al deporte marítimo y los negocios de turismo, tales como hoteles, casas de huéspedes y restaurantes. Esta comunidad es muy visitada por turistas locales y del extranjero.

	ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO	
	SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)	

En el sector de La Parguera existen dos bahías bioluminiscentes: Bahía Monsio José y Bahía La Parguera, mejor conocida como la Bahía Fosforescente, donde la oscuridad de la noche permite apreciar un fenómeno causado por unos microorganismos bioluminiscentes.

2.1.3 BIOLUMINISCENCIA

La bioluminiscencia es un fenómeno único encontrado en algunas bahías de las zonas tropicales. Esta es causada por el microorganismo conocido como dinoflagelado (*Pirodinium bahamense*) que emiten luz cuando son excitados por bañistas, botes y peces, etc. Para que se produzca el fenómeno, las bahías deben poseer unas características físicas, químicas y biológicas particulares. Entre estas están: la bahía debe ser poco profunda (llana), que su entrada sea pequeña y conectada al mar y que esté bordeada por mangles. La última es indispensable, debido a la materia orgánica que estos producen sirven de alimento a los dinoflagelados. Este es un espectáculo único que se aprecia mejor a unas 2 millas del poblado, por lo que hay empresas con embarcaciones que se dedican a llevar a los turistas (y locales) para observarlo.

	ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO	
	SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)	

2.2 PYRODINIUM BAHAMENSE

El dinoflagelado que se pretende estudiar con este sistema autónomo es el bioluminiscente *Pyrodinium bahamense*, que pertenece a la familia de los dinoflagelados, una de las muchas familias que componen el plancton, que a continuación, se describirán a grandes rasgos.

2.2.1 EL PLANCTON

La palabra plancton viene del griego *planktos* que quiere decir lo que va errante, son todos aquellos organismos, desde virus y bacterias a animales, cuya capacidad de locomoción no les permite sustraerse a los movimientos del mar, como olas, mareas y corrientes, y son transportados pasivamente por éstos.

La mayoría de los organismos no son completamente pasivos si no que tienen una cierta capacidad de movimiento, incluido el fitoplancton, que les permite, cuanto menos, realizar migraciones verticales en la columna de agua.

Muchas especies planctónicas son microscópicas, pero el zooplancton incluye animales de hasta varios metros como las medusas.

Dentro del universo del plancton, nos encontramos con distintas familias:

- Fitoplancton y zooplancton.
- Bacterioplancton, micoplancton y viroplancton.
- Meroplancton y holoplancton.



ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO

SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)

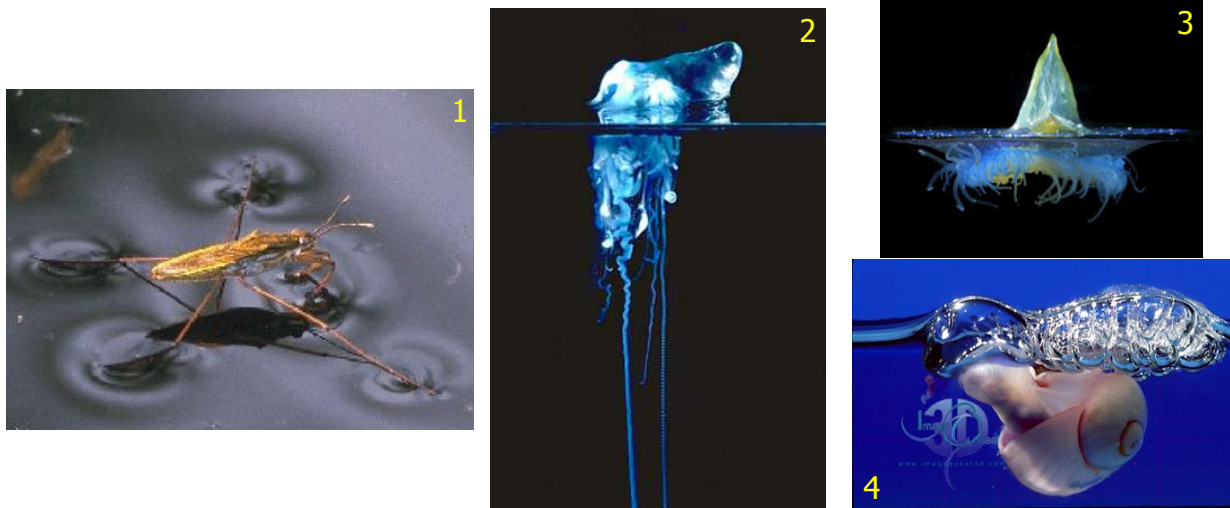




Figura 11. Distintos tipos de plancton.

Neuston: especies estrechamente asociadas a la película superficial del agua (100 μm -1 mm de profundidad), especialmente bacterias y otros microorganismos, y los insectos hemípteros del género *Halobates* (1).

Pleuston: invertebrados que flotan y asoman parcialmente sobre la superficie (sifonóforo, *Physalia*, 2; antomedusa, *Velella*, 3; gasterópodo, *Janthina*, 4); su desplazamiento no sólo está influido por las corrientes, sino también por el viento.

Clase	Femto-plancton (0,02-0,2 μm)	Pico-plancton (0,2-2 μm)	Nano-plancton (2-20 μm)	Micro-plancton (20-200 μm)	Meso-plancton (0,2-20 mm)	Macro-plancton (2-20 cm)	Mega-plancton (20-200 cm)
Viroplancton	■						
Bacterioplancton		■					
Micoplancton			■				
Fitoplancton			■	■	■	■	
Protozooplancton			■	■	■	■	
Metazooplancton				■	■	■	■

Figura 10. Clasificación de familias por tamaños.

	ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO	
	SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)	

2.2.2 EL FITOPLANCTON

Dentro de las familias de plancton, se procederá a hablar del fitoplancton, familia a la que pertenece los dinoflagelados.

A esta familia pertenecen la inmensa mayoría de los vegetales marinos y diversos tipos de algas unicelulares planctónicas. El fitoplancton es la forma de vida vegetal más abundante y ampliamente distribuida de nuestro planeta; su producción anual constituye al menos el 50% de la producción vegetal total, está presente en todas las regiones iluminadas del océano, incluso bajo el hielo de las aguas polares. Su papel en la cadena alimenticia marina es primordial.

Parte del fitoplancton es lo suficientemente grande para ser recogido por redes de plancton muy finas, pero otra parte más pequeña sólo puede separarse recogida filtrando o centrifugando agua.

Clase	Nombre común	Área de predominio	Géneros comunes
Cyanophyceae (Cyanobacteria)	Algas verdiazules o cianobacterias	Tropical	<i>Oscillatoria</i> , <i>Synechococcus</i>
Rhodophyceae	Algas rojas	Templado-frías	<i>Rhodella</i>
Cryptophyceae	Criptomonadales	Costeras	<i>Cryptomonas</i>
Chrysophyceae	Crisomonadales	Costeras	<i>Aureococcus</i>
Chrysophyceae	Silicoflagelados	Aguas frías	<i>Dyctiocha</i>
Bacillariophyceae (Diatomophyceae)	Diatomeas	Todos los mares, especialmente costeros	<i>Coscinodiscus</i> , <i>Chaetoceros</i> , <i>Rhizosolenia</i>
Raphidophyceae	Cloromonadales	Aguas salobres	<i>Heterosigma</i>
Xanthophyceae	Algas verde-amarillas	—	Muy raras
Eustigmatophyceae	—	—	Muy raras
Prymnesiophyceae	Cocolitofóridos	Oceánicas	<i>Emiliana</i>
Prymnesiophyceae	Primnesiomonadales	Costeras	<i>Primnesium</i> , <i>Isochrysis</i>
Euglenophyceae	Euglenoides	Costeras	<i>Eutreptiella</i>
Prasinophyceae	Prasinomonadales	Todos los mares	<i>Tetraselmis</i> , <i>Micromonas</i>
Chlorophyceae	Algas verdes	Costeras	Raras
Pyrrophyceae (Dynophyceae)	Dinoflagelados	Todos los mares, especialmente cálidos	<i>Ceratium</i> , <i>Gonyaulax</i> , <i>Gymnodinium</i>

Figura 12. Composición taxonómica del fitoplancton. Más de 4.000 especies.



2.2.3 DINOFLAGELADOS (*PYRROPHYCEAE*)

De la extensa composición taxonómica del fitoplancton solamente se va a mencionar el grupo de los dinoflagelados, grupo al que pertenece el *Pyrodinium bahamense*, que es el segundo grupo más abundante después de las diatomeas, conteniendo entre 1.500 y 1.800 especies, y son los componentes más numerosos del fitoplancton en las aguas tropicales y subtropicales, que son las más pobres en nutrientes.

Poseen dos flagelos que les permiten moverse, los puede haber desnudos o con una pared de celulosa, en este caso se llaman tecados.

Solamente unas pocas especies son capaces de formar cadenas. Se pueden encontrar con distinto tipo de alimentación:

- Autótrofos, se alimentan a través de la fotosíntesis.
- Mixótrofos, además de alimentarse a través de la fotosíntesis comen fitoplancton y zooplancton.
- Heterótrofos, se alimentan de otros tipos de plancton. Casi el 50% de los dinoflagelados pertenece a este último grupo y forman parte del zooplancton.
- Otras especies son parásitas o simbios.

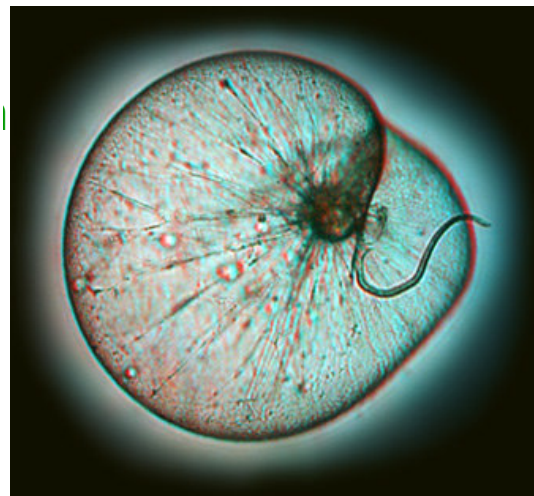


Figura 13. *Noctiluca scintillans*.

Un dinoflagelado heterótrofo.

Se reproducen mediante división asexual simple; un método que aporta un rápido crecimiento de la población cuando se encuentra en condiciones favorables. Salvo en algunas especies que se reproducen sexualmente, pudiendo llevar a la formación de quistes de reposo, que caen al fondo, donde pueden permanecer años y transformarse en células nadadoras cuando detectan condiciones favorables.

Abundan en verano u otoño, siguiendo las explosiones de diatomeas, siendo capaces de vivir con menos luz y nutrientes. Pueden migrar verticalmente; durante el día realizan la fotosíntesis en aguas superficiales, casi desprovistas de nutrientes por las algas que crecen más rápido, y por la noche descienden hacia aguas con mayor concentración de nutrientes.

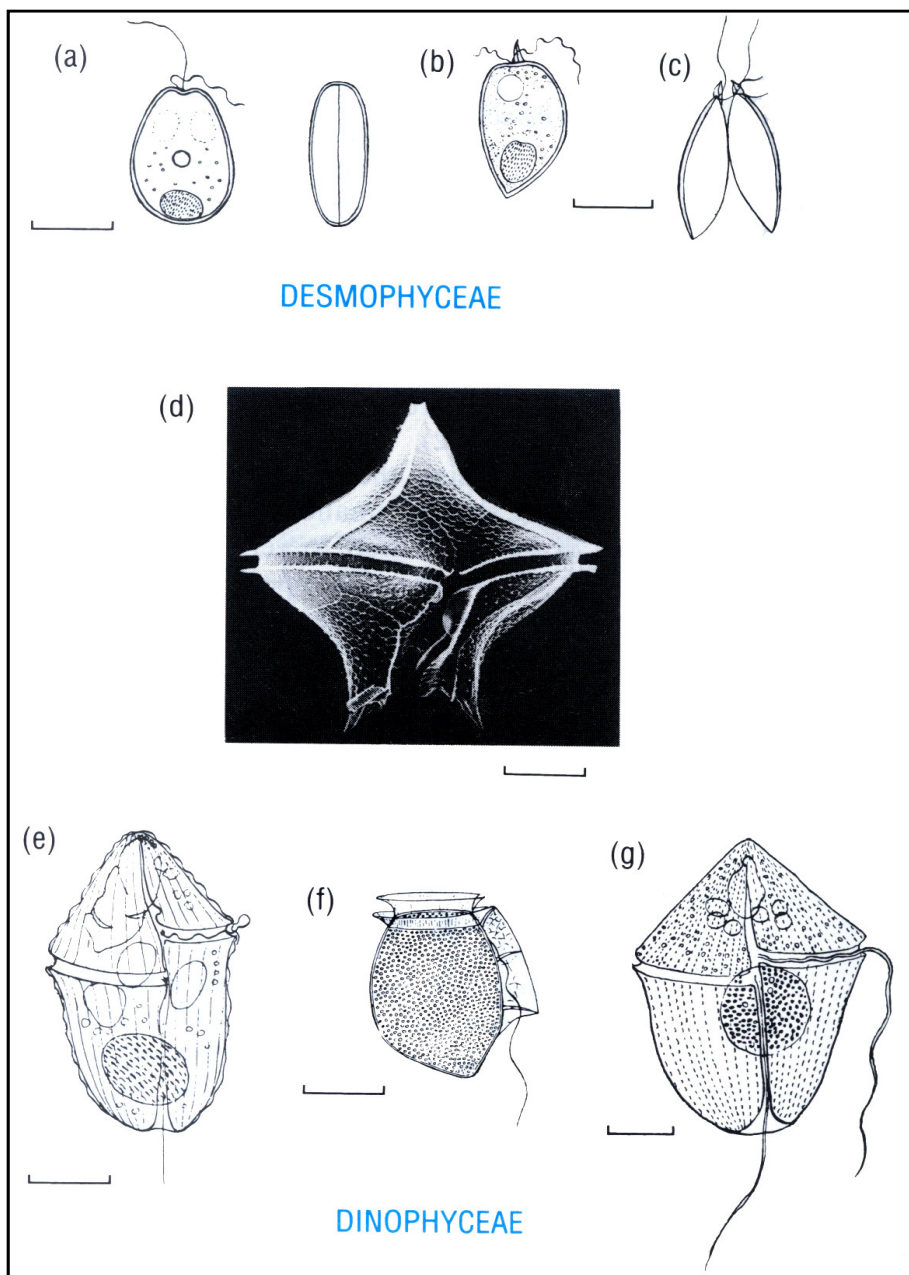


Figura 14.
Prorocentrum spp.
(a, b; c, en división);
Protoperidinium (d),
Gymnodinium (e),
Dinophysis (f) y
Gonyaulax (g).



	<p>ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO</p>	
	<p>SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)</p>	



Figura 15. Mareas rojas o purgas de mar.

Causadas por altas concentraciones de dinoflagelados: especies inocuas o con potentes toxinas ($>100 \times 10^6$ células/litro).

Cuando agotan los nutrientes y la explosión decae, la descomposición de estas grandes cantidades de materia orgánica agota el oxígeno disponible.



2.2.4 PYRODINIUM BAHAMENSE

Los *Pyrodinium bahamense* se pueden encontrar cerca de la costa de muchos países en todo el mundo, siendo más comunes en el hemisferio norte. Son esféricos, con placas blindadas que los rodean, por lo tanto, son tecados. La teca es una cubierta de defensa con poros conocida como trichocysts.

La mayor peculiaridad de estos dinoflagelados es que cuando son agitados, responden brillando intensamente.



Figura 16.
Bioluminiscencia
con respuesta a la
agitación.

Cuando se reúne un gran número, estos dinoflagelados pueden causar mareas rojas conocidas también como Harmful Algal Blooms (HABs). También producen neurotoxinas que son especialmente potentes durante las HABs.

Como otros tipos de fitoplancton, cuando las condiciones son desfavorables, toman forma de quiste, hundiéndose, pudiendo permanecer así hasta que las condiciones mejoren.



ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO

SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING
INSTRUMENT (SaFA)



La mayoría de la literatura especializada los menciona, pero no empiezan a aparecer estudios serios hasta alrededor de la década de los 1950, pero no incluyen información relativa a su origen de aislamiento.

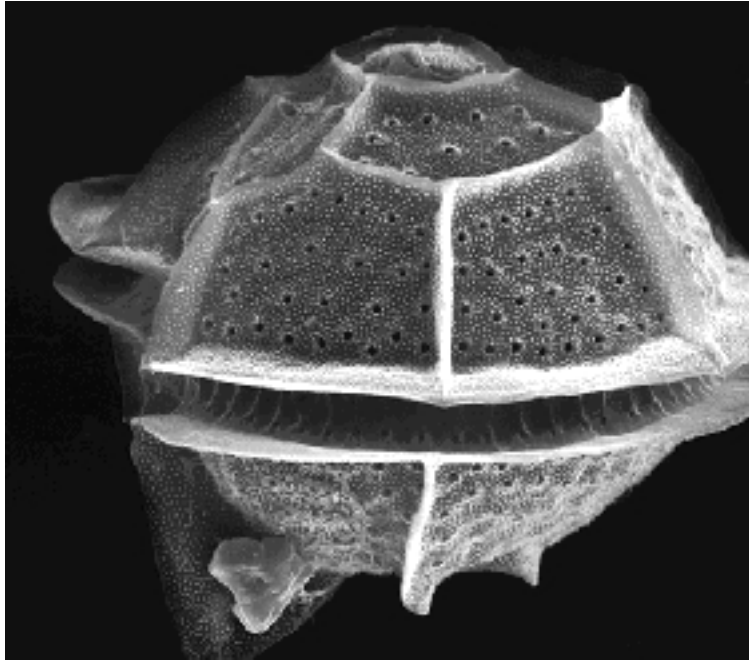




Figura 17. *Pyrodinium bahamense*.
Tienen un flagelo horizontal a lo largo y una hélice vertical como medios de locomoción.

Estructura del genoma

Muy poco del genoma de *Pyrodinium bahamense* ha sido secuenciado hasta ahora. El Amphiesma, la capa externa que abarca la teca, hace que la obtención de datos genéticos sea muy difícil, ésta es la razón por la que no se ha completado todavía.

El ADN almacenado en el núcleo se encuentra en una forma cristalina compacta, además, no tiene histonas para interactuar con su ADN. La gran cantidad y la forma compacta del ADN se sugiere como la causa de su lento crecimiento en comparación con otros organismos unicelulares.

	ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO	
	SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)	

Estructura celular y el metabolismo

Lo más reconocible en el aspecto del *Pyrodinium bahamense* sería el color rojo le da las mareas durante la floración. La clorofila es la que da el color rojo y la capacidad de fotosíntesis.

La estimulación mecánica es la que hará al organismo ser visible a partir de su brillo. En el nivel celular, la teca ofrece una protección de las fuerzas físicas, es un sustrato de membrana altamente selectivo. Los cientos de trichocysts que se extienden sobre la teca proporcionan una protección extra por expulsar las proteínas de largo.

Dentro de la célula, produce luciferina y luciferasa, que son responsables de su brillo cuando son perturbados. Dentro de la *Pyrodinium bahamense* residen bacterias endosimbióticas, como la *Pseudomonas putida*, o especies de *Micrococcus*, entre otras. La mayoría de estas bacterias endosimbióticas son las responsables de la producción de las saxitoxinas, el grupo de neurotoxinas por las que el *Pyrodinium bahamense* es conocido.

Otro aspecto a destacar el *Pyrodinium bahamense* entre otros dinoflagelados es la posibilidad de perder y ganar plástidos.

Ecología

Aparte de ser consumidos por las grandes criaturas se alimentan de plancton, *Pyrodinium bahamense* es también presa de otro dinoflagelado, *scintillans* Noctiluca. (7) El amphiesma en *Pyrodinium bahamense* integra dos mecanismos de protección, la armadura de celulosa, como las placas teca, y los cientos de trichocysts tiro en proteínas. (6) También utilizan la bioluminiscencia como otra defensa cuando una fuerza de agitación se les aplica para asustar a los depredadores. (14) El último mecanismo de defensa que poseen es la saxitoxinas la bacteria endosimbiótica producir para matar a cualquier cosa que se los come. (9) El secuestro de estas toxinas (sobre todo en los mariscos) también afecta a los organismos que se alimentan de crustáceos, que van desde los seres humanos, a las aves. (9)

Flores muy grandes de *Pyrodinium bahamense* son una consecuencia de los patrones del clima, el superávit repentina de los nutrientes y los depredadores no ser capaz de mantener a raya. Florece como de estos y otros dinoflagelados puede resultar en la muerte generalizada de los mismos y de otros organismos dentro del área inmediata. (14) Esto es causado por el consumo *Pyrodinium bahamense* gran parte del oxígeno disuelto en el agua. Una vez que el oxígeno se agota, los organismos mueren. (14)



Patología

Pyrodinium bahamense, junto a otros muchos dinoflagelados, se caracterizan por secretar las toxinas que causan la intoxicación paralizante por mariscos (PSP). Al grupo de las toxinas que se liberan por *Pyrodinium bahamense* se les conoce como saxitoxinas.

Aunque no es especialmente peligroso en el mar abierto, la toxina es acumulada en los mariscos y en los moluscos y es peligroso para los consumidores. El PSP tiene una tasa de mortalidad del 15% en la población humana. Los síntomas aparecen rápidamente una hora después de comer mariscos contaminados, y consisten en entumecimiento, pérdida de la función motora, somnolencia incoherente, y en el peor de los casos, parálisis respiratoria. Los estudios más recientes de PSP sugieren que una variedad de bacterias endosimbiontes son responsables de producir las saxitoxinas.

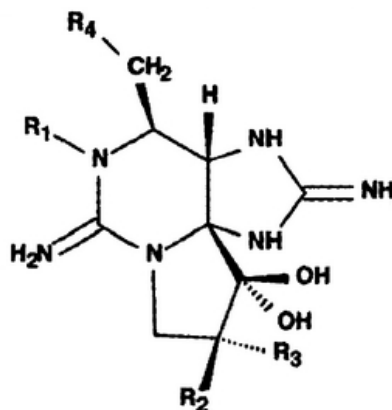




Figura 18. Estructura molecular de la saxitoxina.

Actualmente, la FDA utiliza un kit de prueba conocido como MISTTM Jellett de pruebas rápidas de detección para comprobar los niveles de PSP en moluscos.

Aplicación de la Biotecnología

La luciferina y su enzima luciferasa, son los únicos compuestos de interés que producen, dado que son los responsables de sus propiedades de bioluminiscencia.

La reacción de reducción que se produce en la luciferasa en la que la luciferina utiliza el oxígeno para producir la luz. El proceso exacto de cómo la estimulación mecánica puede causar brillar al *Pyrodinium bahamense* o a otros dinoflagelados bioluminiscentes, aún se desconoce. Una vez conocida, esto podría tener un uso potencial en aplicaciones militares y de investigación.

	ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO	
	SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)	

La investigación actual

1) Michael Latz de la Institución Scripps de Oceanografía, estaba a cargo de un programa de investigación en conjunto con el NAVOCEANO, con el fin de evaluar el efecto que tienen sobre los dinoflagelados bioluminiscentes las hélices de los barcos, para las referencias de la Armada. El propósito del proyecto era acumular información para navegar de forma óptima a través de las bahías bioluminiscentes para predecir y detectar otros barcos. Los *Bahamense Pyrodinium* entre otros dinoflagelados se utilizaron en este estudio para predecir las hélices efecto tendrá en las diferentes áreas en el mundo.

2) En otro proyecto, M. Latz visita las bahías bioluminiscentes, como www.biobays.com en Puerto Rico para estudiar los problemas que puedan existir en sus ecosistemas, con los niveles de bioluminiscencia de las bahías como un indicador de cambio. Este estudio puede impulsar la educación de la población local en la forma de proteger su ecosistema y ayudar a mantener un buen turismo en la zona.

3) Sara Gasparich de Whitman College hizo un estudio que el mismo Latz Biobay M. hizo. El propósito del estudio era medir la concentración de *Pyrodinium bahamense* en pocas bahías de la región. Ella llegó a la conclusión de que la bahía de Puerto Rico es un hábitat único que requiere protección de la urbanización.



3 DISEÑO DEL ARTEFACTO

3.1 DISEÑO HIDRÁULICO

La prioridad del diseño debe ser recoger muestras sin que éstas se puedan ver contaminadas. Se ha tenido que escoger entre dos posibles configuraciones una río arriba y una río abajo.

3.1.1 RÍO ARRIBA

Esta configuración tiene una serie de desventajas, la primera de ellas es que requiere dos jeringas, con la carga energética extra que ello conlleva por lo que necesitaría más baterías.

La otra desventaja y la más importante es que pueden quedar restos de la extracción anterior en el interior de la jeringa, como el agua pasa antes por la jeringa que por los filtros, las muestras pueden verse contaminadas.

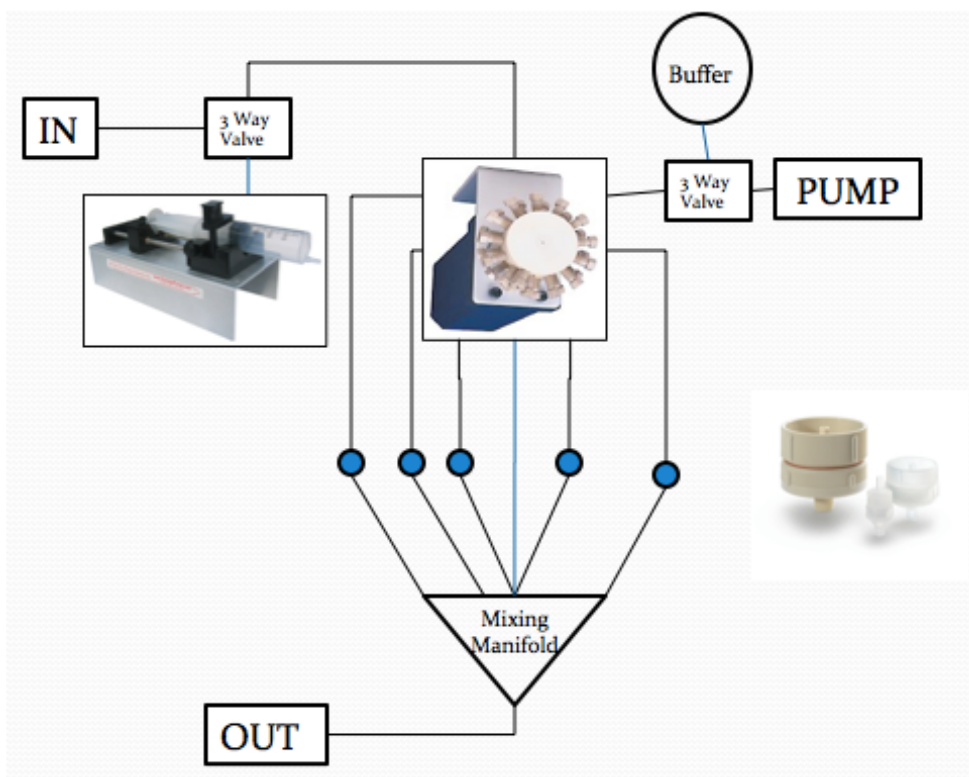


Figura 19.
Configuración
hidráulica río
arriba.

3.1.1 RÍO ABAJO

Esta configuración tiene una serie de ventajas con respecto a la anterior. Solamente es necesaria una jeringa con el ahorro energético que supone, la otra gran ventaja es que tanto el agua como el líquido buffer pasan antes por los filtros que por la jeringa, por lo que no se contaminarían los filtros.

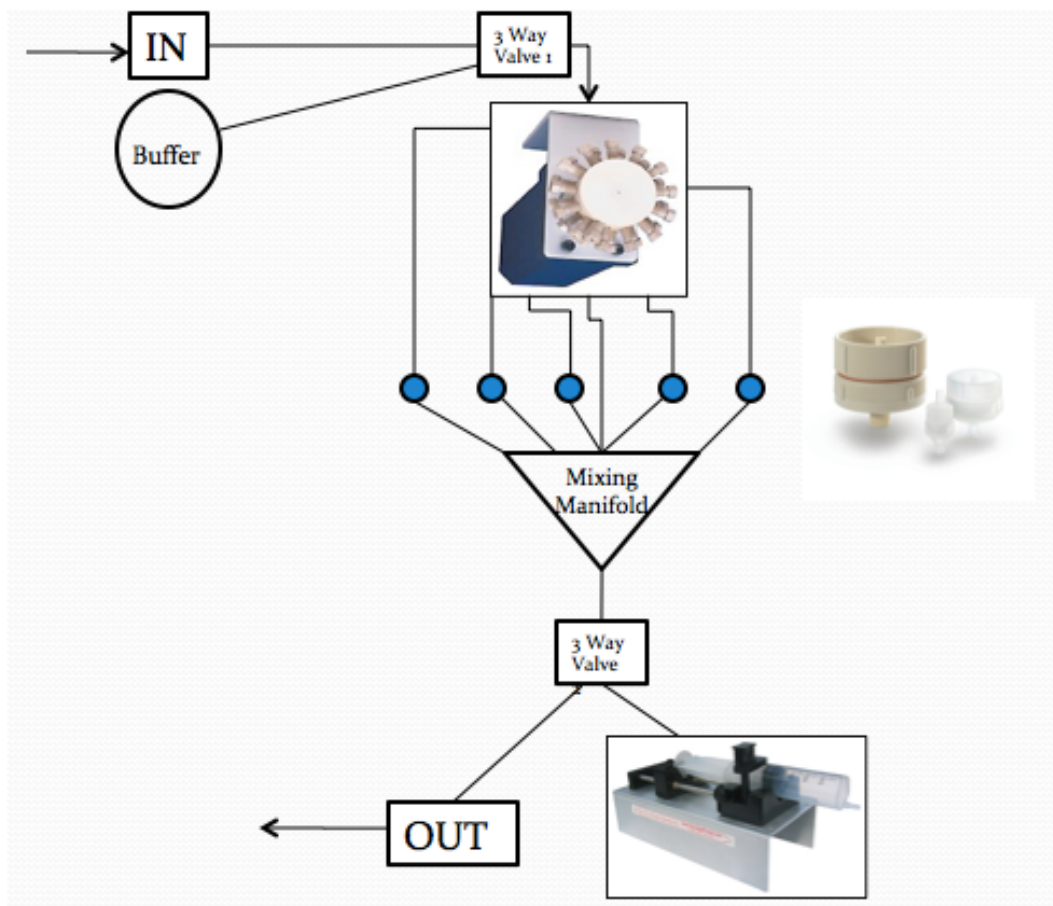




Figura 20. Configuración hidráulica río abajo.

	<p style="text-align: center;">ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO</p> <hr/> <p style="text-align: center;">SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)</p>	

3.2 DISEÑO DE LA CARCASA

3.2.1 PROBLEMAS QUE AFRONTAR

El reto está en construir una carcasa capaz de soportar la presión ejercida por el agua a una profundidad de 100 m, debe poder incluir todos los dispositivos necesarios en su correcta disposición y a su vez ocupar el menor volumen posible, dado que debe ser transportado en una lancha pequeña y el volumen es directamente proporcional a la masa mínima que debe tener para poder vencer las fuerzas boyantes.

De ello surgen los siguientes problemas que se deben afrontar en el diseño:

- Tamaño, el mínimo posible capaz de albergar todos los componentes y de soportar la presión.
- Masa, la mínima posible que sea capaz de vencer a las fuerzas boyantes.
- Vías de agua, el diseño debe ser completamente hermético y evitar cualquier tipo de penetración de agua dentro de la carcasa. Hay que hacer hincapié en que las juntas sean suficientemente buenas para proteger a todos los componentes.
- Colapso, la carcasa debe estar hecha de un material ligero y resistente que soporte la presión necesaria.
- Economía, los materiales y la fabricación deben ser lo más económicas posibles.
- Debe ser accesible para posibles reparaciones y para poder recoger los filtros después de la recogida de material genético que se dará lugar tras cada inmersión.



3.2.2 POSIBLES CONFIGURACIONES

Se tomaron en cuenta tres posibles configuraciones para el diseño de la carcasa:

1. **Carcasa abierta**, una estructura que no hermética que no aísla el interior del agua.

Esta opción presenta los siguientes *inconvenientes*:

- Menor protección de los componentes contra objetos con los que pueda chocar o animales.

	<p>ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO</p>	
	<p>SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)</p>	

- Cada componente debe soportar la presión existente individualmente.
 - Es más difícil proteger la electrónica y las partes móviles del agua y las sales presentes en ella.
 - Presenta una mayor dificultad para ser transportada.
2. **Carcasa horizontal**, una estructura presurizada dispuesta horizontalmente.

Esta opción presenta los siguientes *inconvenientes*:

- Posibles vías de agua debidas a la diferencia de presiones.
- Mayor dificultad para definir un centro de gravedad.
- No es posible usar todo el volumen interno de la carcasa.

3. **Carcasa vertical**, una estructura presurizada dispuesta verticalmente.

En esta opción salva algunos de los *inconvenientes* presentes en las otras opciones, quedando como inconveniente más notorio:

- Posibles vías de agua debidas a la diferencia de presiones.

Se han observado más *ventajas* al utilizar esta disposición:

- Como todas las carcasas cerradas y presurizadas, esta opción mantiene una mejor protección de los componentes.
- Es más fácil de estabilizar.
- Los componentes electrónicos serían guardados en la parte más elevada de la estructura, así, en caso de entrada de agua, sería lo último en mojarse, por lo tanto están bajo una mejor protección.
- Mejor uso del volumen interno de la carcasa.
- Permite distintas configuraciones espaciales de los filtros.

3.2.3 DISEÑO ELEGIDO

Finalmente, se eligió una carcasa cilíndrica cerrada en disposición vertical.

El material elegido para la carcasa es PVC, dado que es el que mejor se adapta a las necesidades del proyecto, tanto por su versatilidad, soporta las presiones necesarias, es fácil trabajar sobre él y es económicamente viable.

Dentro de los PVCs disponibles se ha escogido el PVC Schedule 80 Size 8" que soporta los 146 psi (pounds per square inch) necesarios, o lo que es lo mismo, aproximadamente 10 atm de presión, que es aproximadamente la presión a una profundidad de 100 m.

Nominal Pipe Size (inches)	Collapse Pressure (psi)		Maximum Operating Pressure (psi)	
	Schedule 40	Schedule 80	Schedule 40	Schedule 80
1/2	1605	2006	590	850
3/4	1219	1740	480	690
1	948	1628	450	630
1 1/4	511	1399	365	520
1 1/2	366	1034	330	470
2	213	653	275	400
2 1/2	276	758	300	420
3	179	521	260	370
4	108	334	220	320
6	54	214	180	280
8	37	146	160	250
10	27	125	140	230
12	22	116	130	230

Figura 21. Presiones de colapso de distintos tipos de PVC.



	ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO	
	SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)	

Este tipo de PVC tiene las siguientes medidas:

Diámetro interior:	7,565 in
Diámetro exterior:	8,625 in
Longitud de la carcasa (sin tapas):	38,0 in
Longitud de la carcasa (con tapas):	39,5 in
Volumen interno:	6538,4 in ²
Masa:	3,167 ft * 8,05 lb/ft = 25, 492 lb

PVC and CPVC Pipes - Schedule 80					
Nominal Pipe Size (inches)	Outside Diameter (inches)	Minimum Wall Thickness (inches)	Nominal Inside Diameter (inches)	Weight (lb/ft)	
				PVC	CPVC
1/2	0.840	0.147	0.546	0.20	0.22
3/4	1.050	0.154	0.742	0.27	0.30
1	1.315	0.179	0.957	0.41	0.44
1 1/4	1.660	0.191	1.278	0.52	0.61
1 1/2	1.900	0.200	1.500	0.67	0.74
2	2.375	0.218	1.939	0.95	1.02
2 1/2	2.875	0.276	2.323	1.45	1.56
3	3.500	0.300	2.900	1.94	2.09
4	4.500	0.337	3.826	2.75	3.05
5	5.563	0.375	4.813	3.87	
6	6.625	0.432	5.761	5.42	5.82
8	8.625	0.500	7.625	8.05	8.83
10	10.750	0.593	9.564	12.00	13.09
12	12.750	0.687	11.376	16.50	18.0
14	14.000	0.750	12.500	19.30	
16	16.000	0.843	14.314	25.44	

Figura 22. Dimensiones de distintos tipos de PVC.

	ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO	
	SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)	

Las siguientes figuras corresponden al diseño final de la carcasa. En la figura de la derecha vemos un corte transversal de cómo encaja la tapa con el resto de la carcasa. En la figura de la izquierda vemos como se sujetan las tapas, con unos largueros que se aprietan con tuercas.

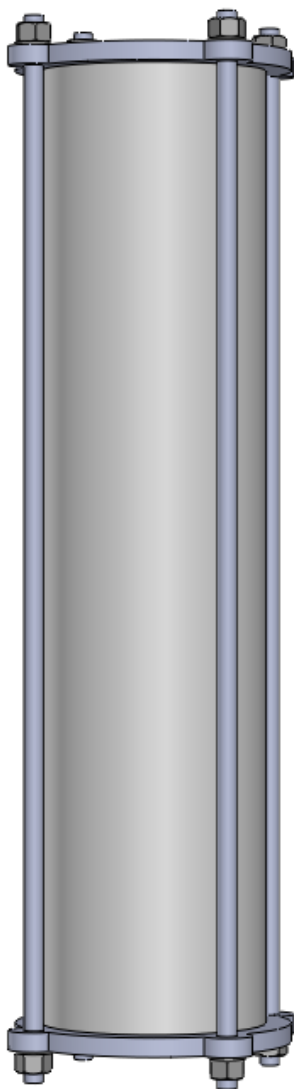


Figura 24. Vista externa de la carcasa.

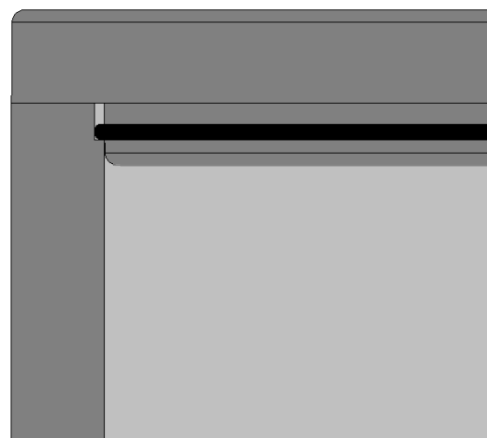


Figura 23. Vista seccionada de la tapa.



Las siguientes imágenes son distintas vistas de la tapa. Las tapas serán de copolímero de acetal por ser un material poco poroso que absorbe menos humedad para conservar mejor la forma en ambientes húmedos.

Vemos los orificios para los cables que comunican con la superficie y para la entrada y salida de agua.

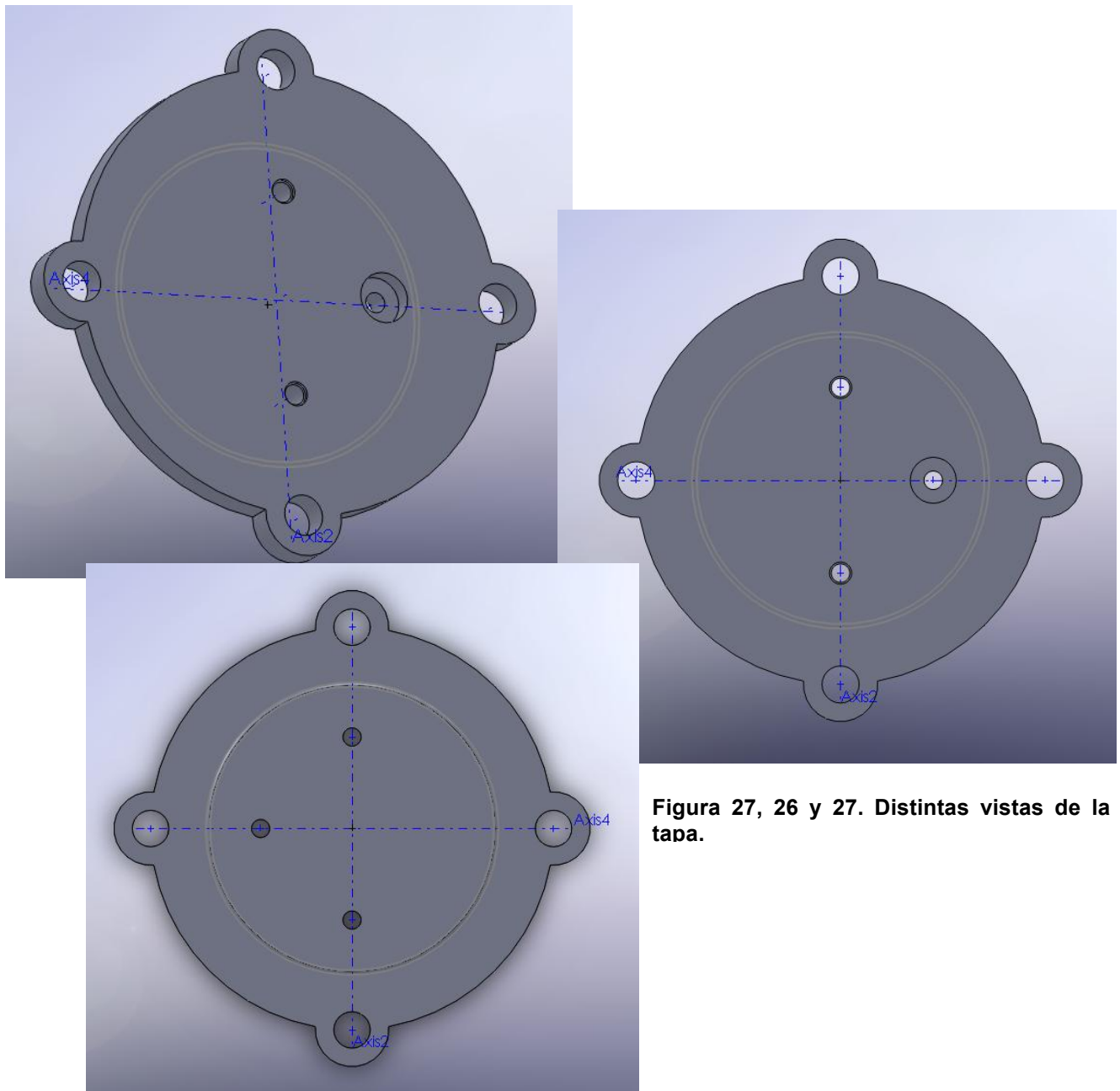




Figura 27, 26 y 27. Distintas vistas de la tapa.

	<p>ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO</p>	
	<p>SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)</p>	

El conector utilizado es un Standard HydroVolt con rosca de 32 mm que permite una inmersión sin peligro de que se mojen los contactos. A continuación vemos unas imágenes ilustrativas.

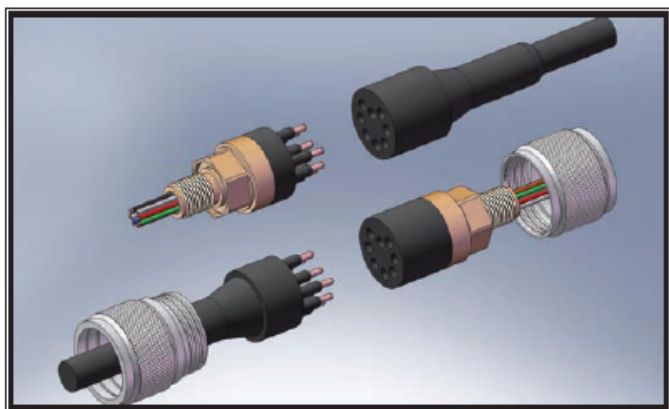


Figura 29. Conectores.



Figura 28. Sellado de conectores.



3.3 ESTRUCTURA INTERNA

Se debía diseñar una estructura interna que no se viera afectada por alguna posible filtración de humedad al interior del habitáculo, que a su vez diera cobijo a todos los componentes necesarios de una forma que no se vieran afectados por los movimientos aleatorios del artefacto y una estructura en la cual fuera sencillo cambiar los filtros de recogida de muestras y no perder mucho tiempo en ello.

Finalmente, ha sido seleccionada una estructura tipo esqueleto. Construida con varillas roscadas de acero inoxidable, tres en el piso bajo en el que se encuentra la batería, de 8 pulgadas de largo, tres en el que contiene los filtros, de 13 pulgadas de largo y tres en el de los componentes electrónicos, de 18 pulgadas cada una.

Todo ello unido con tuercas y arandelas. Dando una altura total aproximada de 35 pulgadas. En los anexos se encuentran las hojas de características de los elementos descritos.

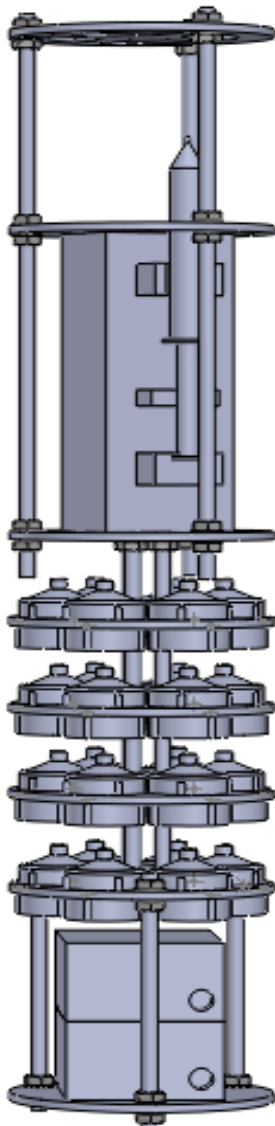


Figura 30.
Esqueleto interno
del SaFA.

El siguiente elemento a describir de la estructura interna son las distintas bandejas, de 7,5 pulgadas de diámetro.

Fabricadas en copolímero de acetal por ser un material poco poroso que absorbe menos humedad para conservar mejor la forma en ambientes húmedos.

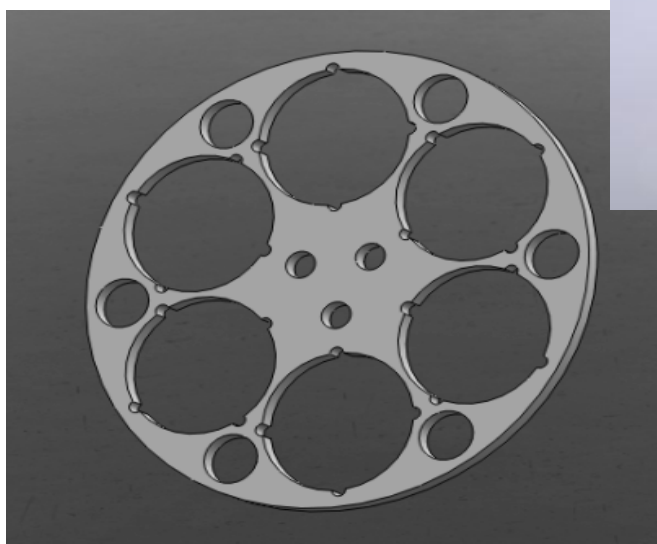


Figura 32. Bandeja para filtros.

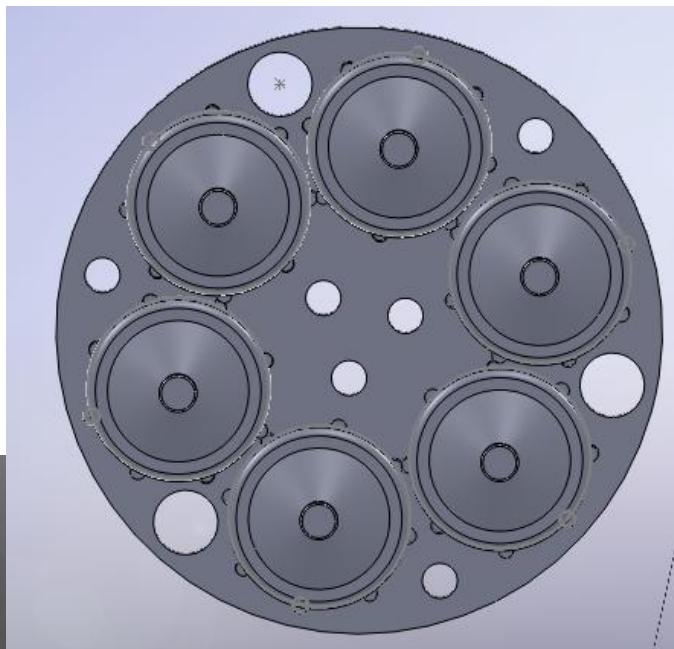




Figura 31. Bandeja para filtros.

Como apreciamos en el detalle de las bandejas que sustentan los filtros, éstas tienen una serie de orificios, tres en el centro que atraviesan las varillas que sustentan el esqueleto interno y seis en el anillo externo que son atravesados por los manguitos hidráulicos.

También tenemos hueco para seis filtros en cada bandeja, ideados para una rápida colocación y extracción, aprovechando la forma de los mismos y sus cuatro protuberancias en los bordes, para introducir haciéndolos coincidir con las de la bandeja y girar los filtros para impedir su salida al no tener ya ese espacio.

Se ha elegido esta construcción por el ahorro que supone una rápida y fácil construcción.

	ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO	
	SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)	

3.4 ELECTRÓNICA DE CONTROL

En el proyecto SaFA, existe la necesidad de implementar una etapa de control que controle una serie de elementos necesarios para llevar a cabo el propósito del mismo.

Esos elementos son los siguientes:

- La jeringa y su mecanismo de control, los cuales, son encargados de mover el agua. Puede ser controlado de dos maneras, por tres señales digitales o por comunicación vía RS232.
- La válvula rotatoria y su mecanismo de control, los cuales, son encargados junto a las válvulas de tres vías de marcar el camino que debe seguir el agua o el líquido buffer. Puede ser controlado con trece señales digitales o mediante comunicación RS232.
- Dos válvulas de tres vías controladas por señales digitales.
- Dos válvulas de dos vías, que impidan o no la entrada o salida de agua externa.

La primera idea para controlar todos estos elementos a su debido tiempo para conseguir unas 24 recolecciones en tres días y a su vez establecer una comunicación externa. Fue utilizar un micro-controlador MSP430, un micro-controlador capaz de realizar todas las funciones necesarias y de implementar un calendario-reloj en tiempo real.

El problema que presenta esta opción es la excesiva complicación tanto a nivel de una primera programación como al de adaptar el hardware a nuestro sistema, dado que se tendría que adquirir una placa en la que colocar el micro-controlador lo que incrementaría a su vez el precio del sistema de control.

Además de estos motivos, por una evidente simplicidad a la hora de tener todos los elementos necesarios en la misma unidad y sobre todo, para que sea mucho más sencillo que distintas personas con distintos niveles de conocimiento técnico puedan colaborar en su programación o efectuar cambios. Estos últimos motivos son los que tuvieron más peso en la elección, dada la naturaleza “*open source*” del proyecto.

Se decide finalmente utilizar un PLC para implementar el sistema de control, el PLC incluye temporizadores, calendario-reloj a tiempo real, entradas y salidas digitales, puertos RS232 y USB, memoria flash interna y una gran simplicidad de programación gracias al software de interfaz de FPWIN PRO. El PLC elegido es el FP0RT32 de la marca Panasonic.

El software de programación presenta una serie de ventajas, respeta el estándar de programación IEC61131-3, lo cual significa que los códigos y la forma de trabajar son compatibles con PLCs de otras marcas. Aunque es un programa de pago, disponemos de una versión demo que nos permite cargar códigos de hasta 2.7 k de memoria, lo cual es suficiente para la aplicación de la que se trata, por lo que no se realizaría desembolso en software de programación.

El esquema de control quedaría de la siguiente manera:

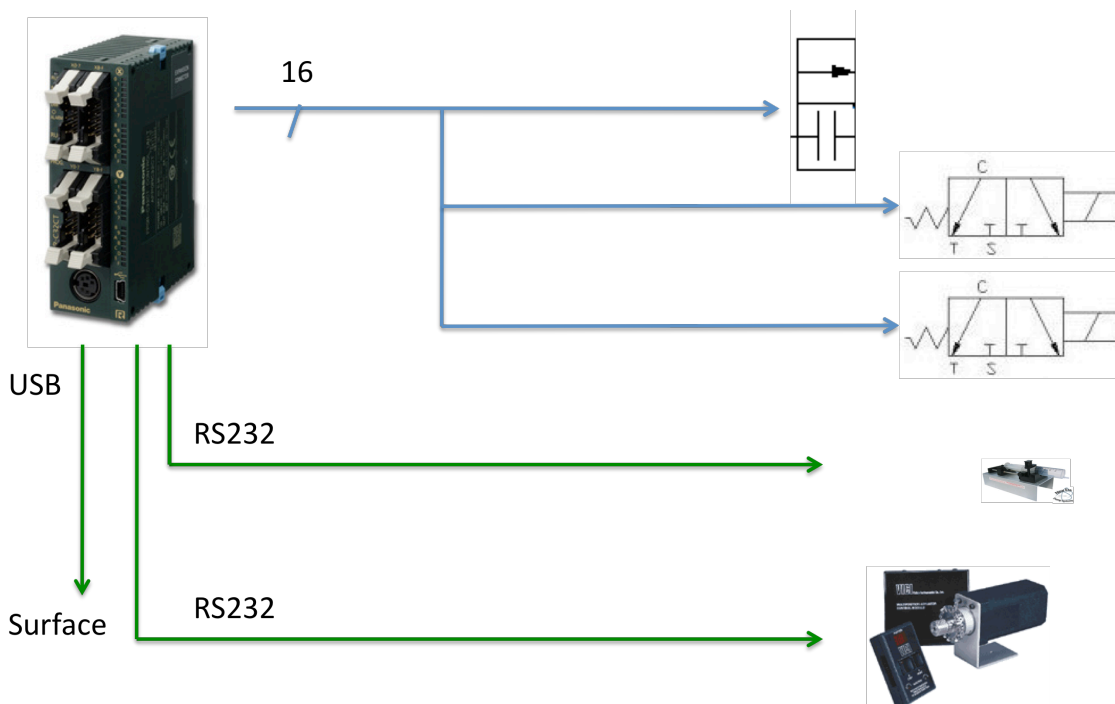




Figura 33. Esquema de control.

	ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO	
	SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)	

Dada la limitación en longitud de una conexión por cable vía USB o RS232, en un futuro se podría sustituir la conexión con la superficie por una conexión inalámbrica, un ejemplo sería el siguiente MODEM subacuático que funciona con un tipo de ondas de radio que pueden pasar por líquidos.

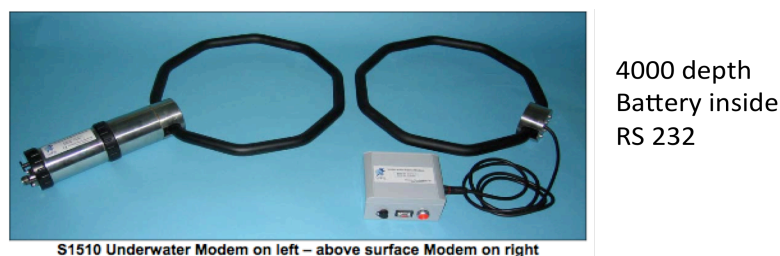


Figura 34. Módem subacuático.

El MODEM funcionaría de forma transparente, lo único que haría sería enviar las señales de un extremo a otro sin afectar al protocolo de comunicación utilizado.

Para poder utilizar esta opción se tendría que cambiar la programación del PLC para controlar la jeringa o la válvula rotativa mediante salidas digitales, dado que solamente existen dos puertos de comunicación USB. Preferentemente cambiaríamos la jeringa, que solamente consta de 3 señales digitales.

Quedando la configuración como vemos en la figura 35.

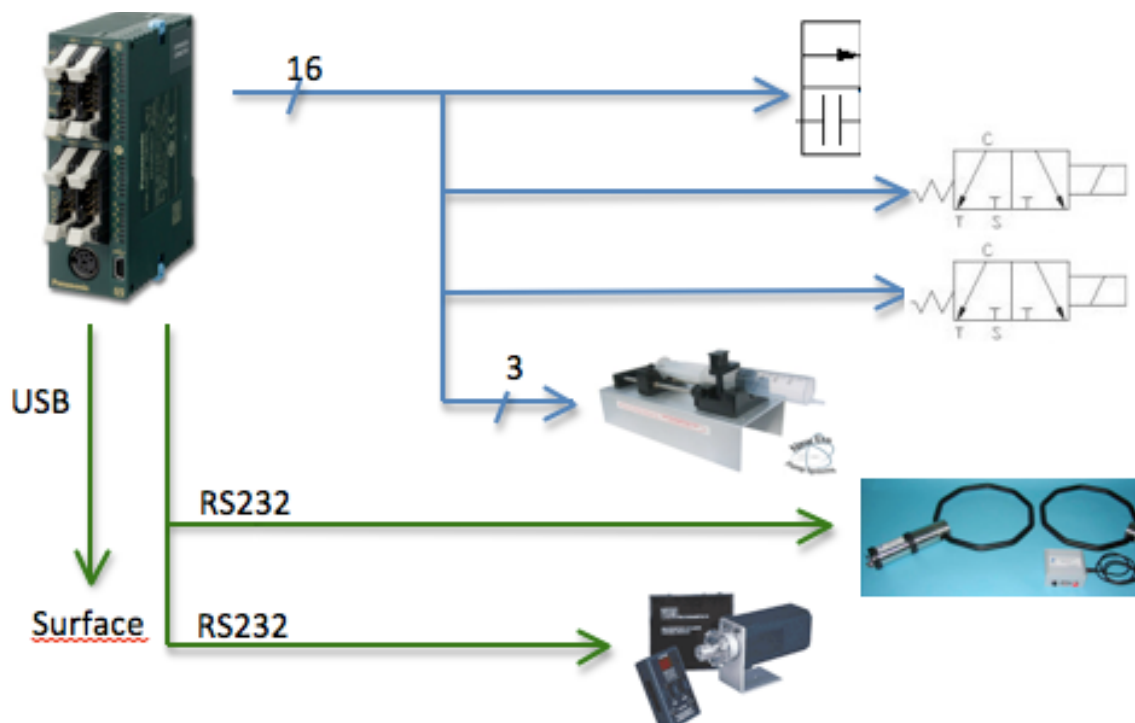


Figura 35. Esquema de control con módem subacuático.



3.4.1 PROGRAMACIÓN DEL PLC

El proceso a efectuar es muy sencillo, cada vez que el reloj en tiempo real coincide con el tiempo preestablecido se iniciará un proceso de recogida de muestras compuesto de los siguientes pasos, podemos ver el diagrama de flujo en la figura 36:

1. Hacer una circulación de agua externa sin pasar por el filtro recolector, para limpiar conductos.
2. Hacer una nueva circulación de agua externa, esta vez, pasando por el filtro recolector, para recoger el material genético.
3. Hacer pasar el líquido buffer por el filtro para ayudar a conservar la muestra.

Este sería el proceso a seguir, para ello se debe conmutar debidamente los distintos filtros, elegir el camino a seguir en el filtro rotatorio y dar las órdenes de extracción y expulsión a la jeringa.

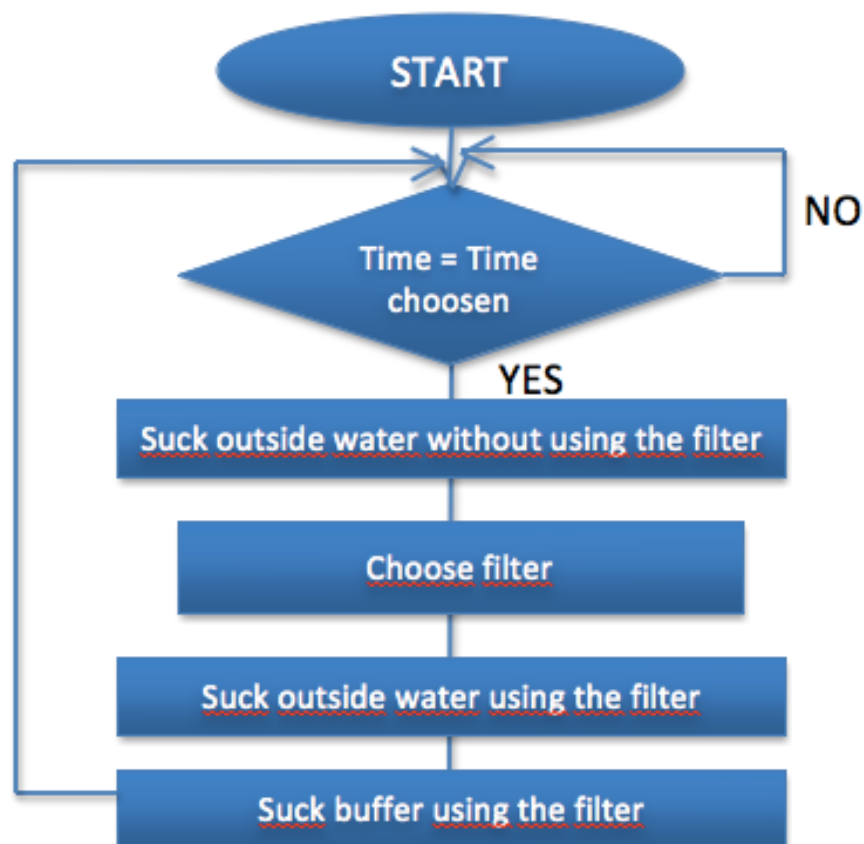


Figura 36. Diagrama de estados.



Para ello se debe pre-programar debidamente la jeringa y con el autómata únicamente darle las órdenes de extraer líquido y expulsarlo, esto se haría previamente conectando directamente la jeringa a un ordenador y cambiando la configuración preexistente. También se puede variar dicha configuración a través del autómata una vez puesto en marcha el equipo, se comprobará si esto es necesario durante las pruebas del prototipo, mientras tanto se configurará previamente.

Esquema del sistema:

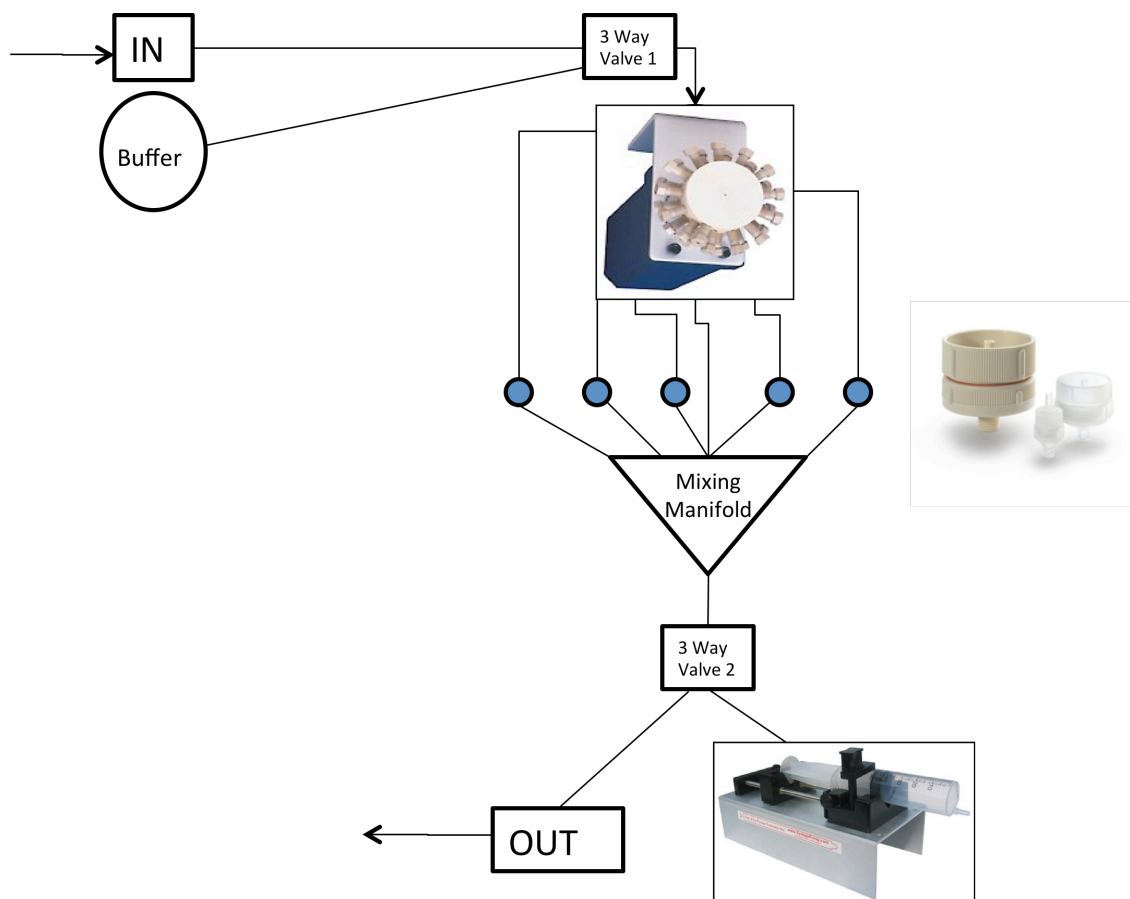




Figura 37. Esquema hidráulico definitivo.

	<p>ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO</p>	
	<p>SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)</p>	



Estado de las válvulas para cada uno de los pasos antes descritos:

1. - La válvula rotativa deberá ponerse en la posición que comunique la salida de la válvula de tres vías 1 con la jeringa sin pasar por ninguno de los filtros.
- La válvula de entrada se abrirá mientras dure el proceso de absorción.
- La válvula de tres vías 1 estará en posición de entrada exterior, no en la posición buffer.
- La válvula de tres vías 2 estará en posición válvula rotativa durante la absorción y en posición out durante la expulsión del agua, quedando permanente la comunicación con la jeringa.
- La válvula de salida se encontrará abierta solamente durante la expulsión.



2. - La válvula rotativa deberá ponerse en la posición que comunique la válvula de tres vías 1 con la jeringa pasando a través del filtro elegido.
- La válvula de entrada se abrirá mientras dure el proceso de absorción.
- La válvula de tres vías 1 estará en posición de entrada exterior, no en la posición buffer.
- La válvula de tres vías 2 estará en posición válvula rotativa durante la absorción y en posición out durante la expulsión del agua.
- La válvula de salida se encontrará abierta solamente durante la expulsión.

3. - La válvula rotativa deberá ponerse en la posición que comunique la válvula de tres vías 1 con la jeringa pasando por el filtro elegido.
- La válvula de entrada se abrirá mientras dure el proceso de absorción.
- La válvula de tres vías 1 estará en posición buffer, no en la posición de entrada exterior.
- La válvula de tres vías 2 estará en posición válvula rotativa durante la absorción y en posición out durante la expulsión del agua.
- La válvula de salida se encontrará abierta solamente durante la expulsión.

Durante cada uno de los pasos el autómatas mandará tres órdenes a la jeringa, una de absorción, una de expulsión y una de paro. También existe la posibilidad de pre-programar la jeringa para realizar el ciclo completo con solo una primera orden, pero la coordinación entre jeringa y válvulas será más precisa si la orden la da el PLC.

	ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO	
	SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)	

Toda comunicación a través de los puertos RS232 será a través de protocolos previamente guardados en la memoria del PLC asignados a un identificador determinado, con lo cual lo único que se tendría que variar en la programación sería mandar una u otra de las cadenas de caracteres ya guardadas como órdenes.

	<div>ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO</div> <div>SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)</div>	
---	---	---

3.5 ELECTRÓNICA DE POTENCIA

Teniendo en cuenta los distintos componentes de los que se compone SaFA, se han estimado los consumos de los mismos para la actividad que desempeñarán en este caso en concreto.

Se ha dimensionado de tal manera que podamos tener un funcionamiento de al menos 72 h, que es lo que se estima que durarán las inmersiones.

Éstos son los resultados del balance energético calculado (cálculos presentes en un anexo):

Consumo del PLC:	-52 W*h
Consumo de las válvulas:	-8 W*h
Consumo de la válvula rotativa:	-174 W*h
Aporte de las baterías:	+412 W*h
Disponible para jeringa:	-178 W*h

Vemos que la energía total aportada por las baterías es de 412 W*h, la consumida por el PLC la estimamos en aproximadamente 52 W*h como máximo y la consumida por las válvulas de aproximadamente 8 W*h, lo cual nos dejaría libre unos 180 W*h que serían los que la jeringa utilizaría en su funcionamiento, una cantidad de energía a priori suficiente aunque no se han podido hacer estimaciones energéticas de lo consumido por la jeringa debido a las peculiaridades del ambiente de trabajo al que sería expuesto, así cualquier prueba fuera de ese ambiente sería irreal.

Cabe destacar que las válvulas elegidas deben ser de 24 V para mantener una homogeneidad en los distintos elementos.

Las baterías funcionan con dos celdas de 10-16.5 Vdc que se pueden utilizar en paralelo (para aumentar el tiempo de funcionamiento a una tensión de 10-16.5 Vdc) o en serie que lo que aumentaría sería la tensión de funcionamiento a la suma de los dos voltajes 20-33 Vdc. En este caso, se utilizarán dos baterías, en cada una de ellas sus dos celdas se colocarán en serie para aumentar la tensión de funcionamiento, y las baterías en su totalidad se pondrán en paralelo para aumentar el tiempo de funcionamiento a esa tensión.

Se presenta a continuación un esquema de cómo quedaría la alimentación del sistema:

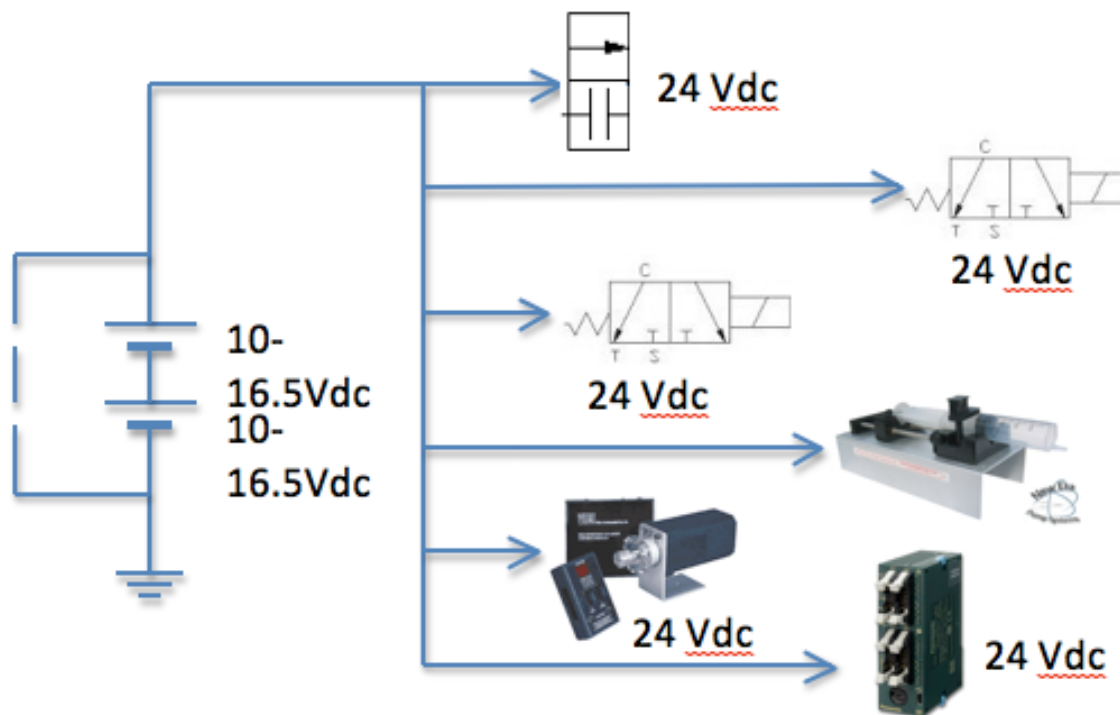




Figura 38. Esquema eléctrico de potencia.

	ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO	
	SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)	

3.6 COMPONENTES

A continuación procederemos a enumerar los distintos componentes de los que partimos para efectuar el diseño del artefacto, algunos de ellos son elegidos por nosotros y otros indispensables, dado el objetivo biológico del proyecto.

3.6.1 BOMBA DE JERINGA

Se utilizará una jeringa de succión por control electrónico tipo NE-501 fabricada por New Era Pump Systems, Inc., por sus siguientes características:

- Precisión en el control de volúmenes.
- Bloqueo de protección del sistema.
- Controlado por puerto RS232 o por tres señales digitales a 5V.
- Se puede programar sus movimientos y características previamente, descargando en ella una hoja Excel.
- Las jeringas son intercambiales y desechables.
- Se alimenta a 24 Vdc.

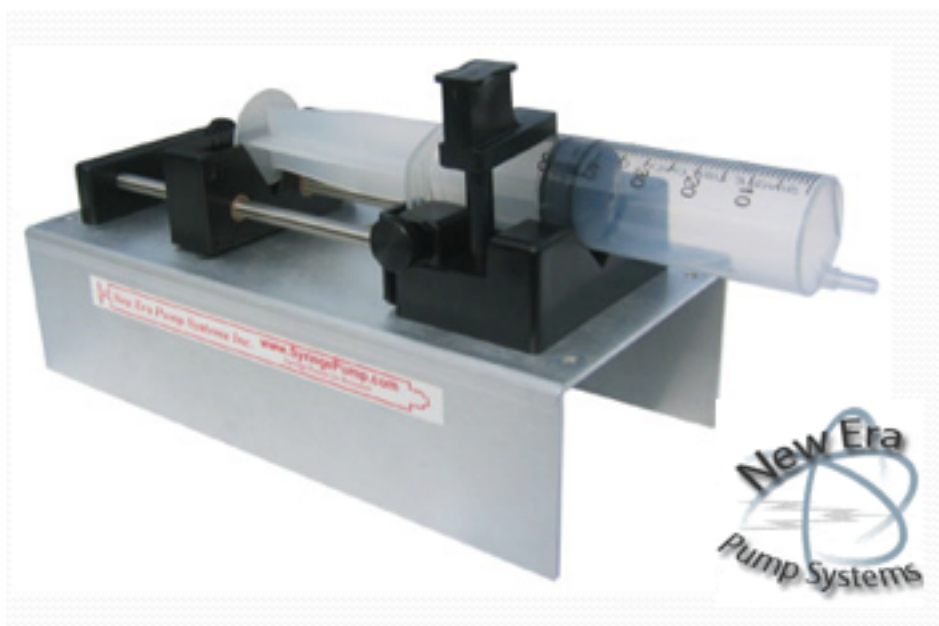


Figura 39.
Jeringa de
succión.

3.6.2 VÁLVULA ROTATIVA

La válvula rotativa será necesaria para distribuir el agua y el líquido de buffer en los de los que dispondrá en sistema, la elegida es la Cheminert® modelo C35Z HPLC, de 26 vías.

Dispone de un sistema de giro con un motor eléctrico paso a paso, pudiendo ser controlado vía RS232. Se alimenta a 24 Vdc.

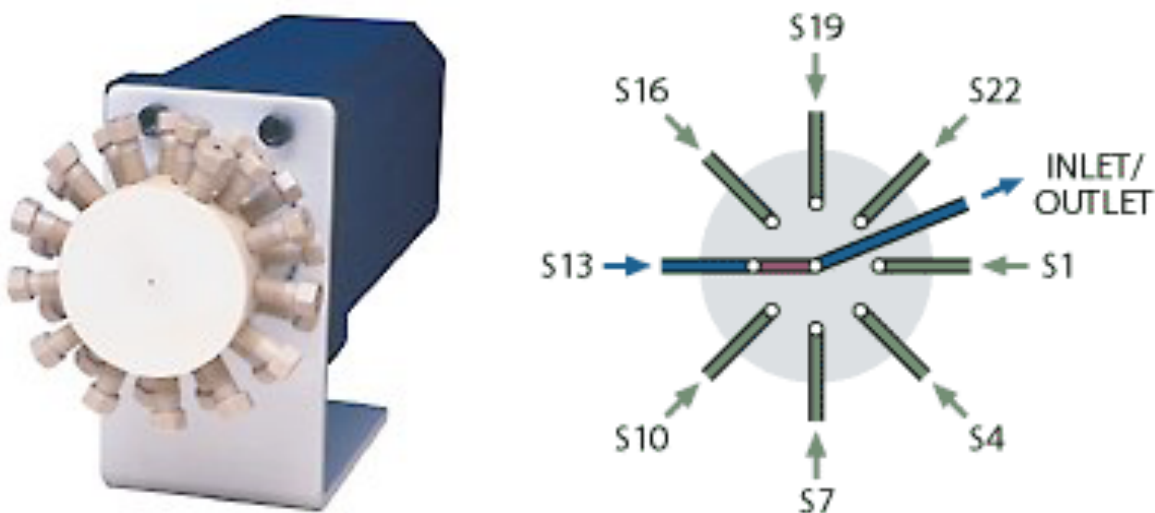


Figura 40. Válvula Rotativa y esquema resumido de sus vías.

3.6.3 FILTROS

Se utilizarán filtros de polipropileno tipo Millipore™ Swinnex de 47 mm.



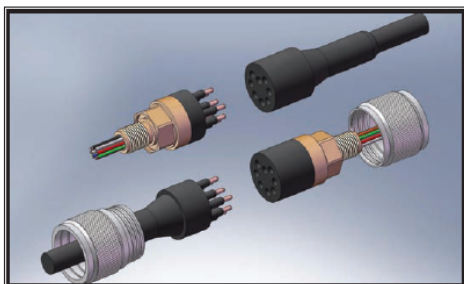
Figura 41. Filtros utilizados.

3.6.4 CONECTORES

Se utilizarán conectores estancos, capaces de aguantar la presión necesaria. Son Standard HydroVolt: B-Size, de 32mm de diámetro.

Standard HydroVolt: B - Size, 1.25" (32mm) dia

HydroVolt: B - Size, 1.25" (32mm) dia



HydroVolt: B - size has a 1.25 inch (32mm) diameter form factor. It is the intermediate standard size. Contact patterns available include 6, 8, and 10.

Standard HydroVolt: B - Size, 1.25" (32mm) dia

HydroVolt: B - Size, 1.25" (32mm) dia - Dimensions

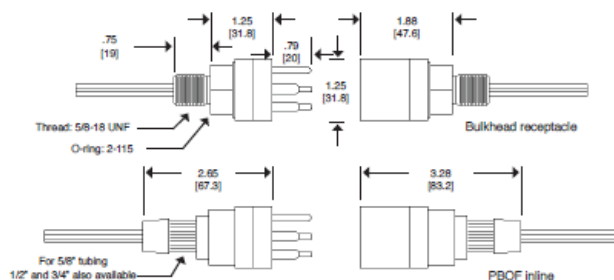


Figura 42. Conector utilizado.

3.6.5 COMPONENTES DEL ESQUELETO INTERNO

A continuación se muestran las características de las tuercas, largueros y tuberías utilizados en la construcción del sistema SaFA.

Thin Hex Nuts



Also known as jam nuts and half-height nuts, perfect in tight spaces. Often used in pairs, one is "jammed" against the other to prevent loosening. All have a Class 2B thread fit. Sizes 1 1/2" and smaller have dimensions that meet ANSI/ASME B18.2.2 (unless noted).

Thread Size	Width	Height	Pkg. Qty.	Per Pkg.
Plain 18-8 Stainless Steel				
7/16"-14	11/16"	1/4"	50	91847A510 \$10.15

Figura 43. Tuercas utilizadas.

Threaded Rods and Studs

This product matches all of your selections.



Part Number: 98920A032

Material Type	Stainless Steel
Finish	Plain
Grade/Class	Not Rated
Type	Fully Threaded Rods and Studs
Stainless Steel Type	18-8 Stainless Steel
Thread Direction	Right Hand Thread
Inch Thread Size	7/16"-14
Overall Length	6'
Rockwell Hardness	Minimum B70
Minimum Tensile Strength	70,000 psi
Thread Fit	Class 1A
Specifications Met	Not Rated
Notes	Length is measured from end to end.

Figura 44. Largueros utilizados.



3.6.6 PLC

Se ha elegido un PLC en lugar de un microcontrolador, porque creemos que es más sencilla una modificación posterior, más acorde con el espíritu “open source” del sistema. Además, incluye temporizador, calendario-reloj en tiempo real, salidas y entradas digitales, dos salidas RS 232, una salida USB y memoria flash interna.

El elegido es un PLC de Panasonic Electronic Works modelo FP0 R32TC, con las características antes expuestas y alimentado a 24 Vdc.

El PLC se programa utilizando el software de Panasonic FPLWIN PRO, es un software que sigue el estándar IEC61161-3 que utiliza los mismos lenguajes de programación que todos los que sigan ese estándar, son cinco lenguajes de programación distintos. Dispone de certificado PLCopen. Es un programa de pago que dispone de una versión gratuita para programas de poca densidad, como es el caso.



Figura 45. FP0 R32 TC

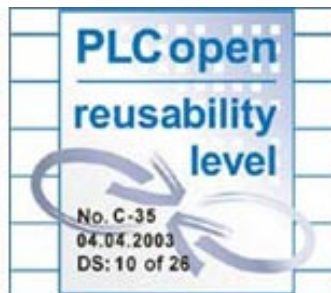
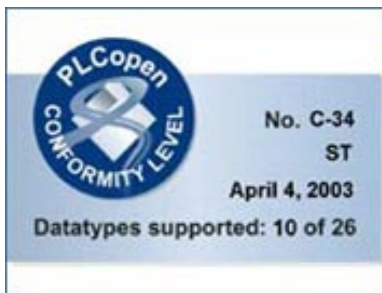




Figura 46. Certificados del FPLWIN PRO.

	<p>ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO</p>	
	<p>SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)</p>	

3.6.7 BATERÍAS

Se utilizan baterías militares recargables de ión litio, con dos secciones de 14 Vdc nominales, las cuales se pueden utilizar en serie o en paralelo dando de 10 a 16,5 Vdc en paralelo o de 20 a 23 Vdc en serie. Cada batería da 206 W*h y se utilizarán dos de estas baterías en el sistema SaFA.

Se han elegido estas baterías por ser pequeñas y ligeras en relación a la carga energética que dan. Son baterías Ultralife.



Figura 47. Baterías utilizadas

3.6.8 MODEM SUBACUÁTICO

Se ha contemplado la posibilidad de añadir comunicación inalámbrica con el sistema SaFA desde el exterior. Al tener que atravesar agua, no son posibles comunicaciones inalámbricas normales, así, que se ha encontrado un módem especializado.



Se trata de un Trittech modelo S1510, que actúa de forma transparente, la misma trama que entra es la que comunica y sale por el otro lado.



S1510 Underwater Modem on left – above surface Modem on right



Technical Specification	
<p>Performance</p> <ul style="list-style-type: none"> • Data rate 0-16 kbits/sec • Half or full duplex • Supporting PC software • Multiplexing – multiple units addressed by unique codes <p>Antenna</p> <ul style="list-style-type: none"> • Magnetic coupled loop • Options available for extended range <p>Data</p> <ul style="list-style-type: none"> • RS 232 data interface • Analogue interface for sensors without a microprocessor 	<p>Power Requirements</p> <p>Application dependent e.g. 40 bits/sec modem powered from 2 Lithium D-cells</p> <ul style="list-style-type: none"> • 2 years operation in listening mode • 60 hours transmit • Low power standby mode with wakeup timer <p>Physical (typical)</p> <p>Modem housing - 315mm x 315 mm</p> <p>Antenna – application dependent</p> <p>Environmental</p> <ul style="list-style-type: none"> • 4,000m depth • Temp. operating -10 to + 35°C

Figura 48. Módem subacuático.

	<p>ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO</p>	
	<p>SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)</p>	

4 PRESUPUESTO



Cantidad	Elemento	Precio Unidad	Precio
1	Thick-Wall Dark Gray PVC Unthreaded Pipe 8" Pipe Size X 5' Length, Schedule 80	\$103.00 each	\$103.00
1	Acetal Copolymer Sheet 1-1/4" Thick, 12" X 24", White	\$186.77 each	\$186.77
1	Acetal Copolymer Rod 7-1/2" Diameter, Black	\$237.34 ft.	\$237.34
8	18-8 Stainless Steel Thick Flat Washer 3/4" Screw Size, 1-5/8" OD, .14"-.17" Thick	\$2.71 pack	\$21.68
8	Type 316 Stainless Steel Thin Hex Nut 3/4"-16 Thread Size, 1-1/8" Width, 27/64" Height	\$2.14 pack	\$17.12
4	ASTM A193 Grade B8 SS Fully Threaded Rod, 3/4"-16 Thread, 6' Length	\$82.80 pack	\$331.20
2	18-8 Stainless Steel Thin Hex Nut 7/16"-14 Thread Size, 11/16" Width, 1/4" Height, packs of 50	\$10.15 pack	\$20.30
2	18-8 Stainless Steel Threaded Rod 7/16"-14 Thread, 6' Length	\$18.81 each	\$37.62
7	18-8 Stainless Steel Type A SAE Flat Washer 7/16" Screw Size, 59/64" OD, .05"-.08" Thick, packs of 10	\$2.84 pack	\$19.88
24	Filtros Millipore™ Swinnex de 47 mm	\$40.00 each	\$960.00
1	Rotatory valve	\$1,800.00	\$1,800.00
1	FP0R32TD	\$200.00	\$200.00
3	Three way valve	\$140.00 each	\$360.00
2	Two way valve high pressure	\$200.00 each	\$200.00
2	Battery ultralife	\$500.00 each	\$1000.00

	<p>ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO</p>	
	<p>SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)</p>	

Sumando todo lo anterior un total gastado en componentes de :

\$5.494,91

Al ser un proyecto basado en la filosofía “open source”, no cargamos nada al diseño, ya que cualquier persona puede acceder al mismo de forma gratuita.

	<p>ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO</p>	
	<p>SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)</p>	

5 CONCLUSIÓN

Se ha desarrollado un proyecto acorde con los objetivos propuestos, un sistema que es capaz de recoger veinticuatro muestras genéticas durante tres días. El sistema es autónomo completamente, aunque está previsto que el prototipo se comunique a través de un cable con la barca, en un futuro se utilizaría un módem subacuático

Según la filosofía “open source”, tras la construcción del prototipo se colgarán en internet todos los planos y métodos utilizados para la construcción del mismo y se probará en aguas cercanas a la facultad de ciencias marinas de la universidad de Puerto Rico, cerca de La Parguera, bajo la supervisión del director de proyecto, el señor Smith.

Se trata de un sistema autónomo, capaz de aguantar la presión de 200 m de profundidad, compuesto de una carcasa externa, un esqueleto interno en el que están dispuestos en distintas alturas los componentes del sistema. En el primer nivel las baterías militares elegidas, en el segundo, las distintas bandejas que contienen los filtros que recogerán el material genético, y en el nivel superior, el más elevado y seguro, todos los componentes electrónicos.

Con una jeringa controlada por un PLC, se hará pasar agua del entorno a través de los filtros, al hacer esto se quedarán los restos genéticos en los filtros, después de ello se hará pasar el líquido buffer a través de los filtros, para ayudar a conservar las muestras. Después de los tres días y con las muestras recogidas, se sacará el sistema del agua para analizar las muestras y cargar las baterías.

Se ha alcanzado un resultado satisfactorio en el desarrollo del proyecto, tanto en precio como en prestaciones, aun así, se irá mejorando con las pruebas de los prototipos en entornos reales.



6 BIBLIOGRAFÍA

- Lalli, C. M. y Parsons, T. R. 1997. *Biological Oceanography: an introduction*. The Open University, Butterworth-Heinemann, Oxford, 314 pp.
- Duxbury, A. B., Duxbury, A. C. y Sverdrup, K. A. 2002. *Fundamentals of Oceanography, Fourth Edition*. McGraw-Hill Higher Education, Boston, 344 pp.
- Nybakken, J. 2001. *Marine Biology 5th ed - An Ecological Approach*. Benjamin Cummings, San Francisco, 566 pp.
- http://es.wikipedia.org/wiki/Open_source
- es.wikipedia.org/wiki/La_Parguera
- <http://marenostrum.org>
- http://www.engineeringtoolbox.com/pvc-cpvc-pipes-dimensions-d_795.html
- Beal, S.W., and Sherman, D. (2000). SIP versus SOC: Partitioning Instead of Integrating. *Integrated System Design Magazine*.
- Brown, K.M. (2004). System in Package "The Rebirth of SiP". *Custom Integrated Circuits Conference 2004*: 681-686.
- Brown, M.V., Schwalbach, M.S., Hewson, I., and Fuhrman, J.A. (2005). Coupling 16S-ITS rDNA clone libraries and automated ribosomal intergenic spacer analysis to show marine microbial diversity: development and application to a time series. *Environ. Microbiol.* 7: 1466-1479.
- Carpenter, S.R., Lathrop, R.C., Nowak, P., Armstrong, D.E., Bennett, E.M., Reed-Andersen, T., and Soranno, P.A. (2006). The Ongoing Experiment: Restoration of Lake Mendota and its Watershed, In *Long Term Dynamics of Lakes in the Landscape*. Magnuson, J.J., Kratz, T.K., and Benson, B.J. (eds). Oxford: Oxford Press.
- Carpenter, S.R., Ludwig, D., and Brock, W.A. (1999). Management of eutrophication for lakes subject to potentially irreversible change. *Ecological Applications* 9: 751-771.
- Fisher, M.M., and Triplett, E.W. (1999). Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4630-4636.
- Fuhrman, J.A., Hewson, I., Schwalbach, M.S., Steele, J.A., Brown, M.V., and Naeem, S. (2006). Annually reoccurring bacterial communities are predictable from ocean conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 13104-13109.
- Garcia Martin, H., Ivanova, N., Kunin, V., Warnecke, F., Barry, K., McHardy, A.C.,



ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO

SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING
INSTRUMENT (SaFA)



- Yeates, C., He, S., Salamov, A., Szeto, E., Dalin, E., Putnam, N., Rigoutsos, I., Kyrpides, N., Blackall, L.L., McMahon, K.D., and Hugenholtz, P. (2006). Metagenomic analysis of phosphorus removing sludge communities. *Nature. Biotechnol.* 24: 1263-1269.
- Greenfield, D.I., Marin III, R., Jensen, S., Massion, E., Roman, B., Feldman, J., and Scholin, C.A. (2006). Oceanography: Methods. *Limnol. Oceanogr. Methods.* 4: 426-435.
 - He S, Kunin V, Haynes M, Garcia Martin H, Ivanova N, Kyrpides N, Rohwer F, Hugenholtz P, McMahon KD. (2008, Submitted). Metatranscriptomic analysis of "*Candidatus Accumulibacter*"-enriched enhanced biological phosphorus removal sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*
 - He, S., Gall, D.L., and McMahon, K.D. (2007). "*Candidatus Accumulibacter*" population structure in enhanced biological phosphorus removal sludges as revealed by polyphosphate kinase
 - genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 5865-5874. He, S., Gu, A.Z., and McMahon, K.D. (2006). Fine-scale differences between *Accumulibacter*-like
 - bacteria in enhanced biological phosphorus removal activated sludge. *Wat. Sci. Tech.* 54: 111-117.
 - He, S., Gu, A.Z., and McMahon, K.D. (2008). Progress towards understanding the distribution of
 - *Accumulibacter* among full-scale enhanced biological phosphorus removal systems. *Microb. Ecol.* 55: 229-236.
 - Jones, S.E., and McMahon, K.D. (2008 Submitted). Immigration and species sorting in aquatic
 - bacterial communities. *Environ. Microbiol.* Jones SE, Kratz TK, Chiu C, McMahon KD. (2008 In Press). The influence of typhoons on annual
 - CO₂ flux from a sub-tropical, humic lake. *Global Change Biol.* Jones, S.E., Chiu, C.Y., Kratz, T.K., Wu, J.T., Shade, A., and McMahon, K.D. (2008a). Typhoons
 - initiate predictable change in aquatic bacterial communities. *Limnol. Oceanogr.* 53: 1319-1326.
 - Jones, S.E., Newton, R.J., and McMahon, K.D. (2008b). Potential for atmospheric deposition of
 - bacteria to influence bacterioplankton communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 64: 388-394.
 - Jones, S.E., Shade, A.L., McMahon, K.D., and Kent, A.D. (2007). Comparison of primer sets for use in automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) of aquatic bacterial communities: an ecological perspective. *Appl. Environ. Microbiol.*



ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO

SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING
INSTRUMENT (SaFA)



- 73: 659-662. Jones, W.J., Preston, C.M., Marin III, R., Scholin, C.A., and Vrijenhoek, R.C. (2008). A robotic molecular method for in situ detection of marine invertebrate larvae. *Molecular Ecology*
- *Resources* 8: 540-550. Kent, A.D., Yannarell, A.C., Rusak, J.A., Triplett, E.W., and McMahon, K.D. (2007). Synchrony in
 - aquatic microbial community dynamics. *ISME. J.* 1: 38-47. Kunin, V., He, S., Warnecke, F., Peterson, S.B., Garcia Martin, H., Haynes, M., Ivanova, N.,
 - Blackall, L.L., Breitbart, M., Rohwer, F., McMahon, K.D., and Hugenholtz, P. (2008). A bacterial metapopulation adapts locally to phage predation despite global dispersal. *Genome Res.* 18: 293-297.
 - Legendre, P., and Legendre, L. (1998) Numerical Ecology. Amsterdam: Elsevier Science, BV. Newton, R.J., Jones, S.E., Helmus, M.R., and McMahon, K.D. (2007). The phylogenetic ecology of
 - the freshwater *acl* lineage. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 7169-7176. Olson, R.J., Shalapyonok, A., and Sosik, H.M. (2003). An automated submersible flow cytometer
 - for analyzing pico-and nanophytoplankton: FlowCytobot. *Deep Sea Res. Part. I.* 50: 301-315. Paul, J.H., Scholin, C., Van Den Engh, G., and Perry, M.J. (2007). In situ instrumentation.
 - *Oceanography* 20. Peterson SB, Warnecke F, Madejska J, McMahon KD, Hugenholtz P. (2008 In Press).
 - Environmental distribution and population biology of the genus *Accumulibacter*, a primary
 - agent of biological phosphorus removal in activated sludge. *Environ. Microbiol.* R Development Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R.
 - Foundation For Statistical Computing, Vienna, Austria 2008.
 - Remsen, A., Hopkins, T.L., and Samson, S. (2004). What you see is not what you catch: a comparison of concurrently collected net, Optical Plankton Counter, and Shadowed Image Particle Profiling Evaluation Recorder data from the northeast Gulf of Mexico. *Deep Sea Res. Part. I.* 51: 129-151.
 - Robbins, I.C., Kirkpatrick, G.J., Blackwell, S.M., Hillier, J., Knight, C.A., and Moline, M.A. (2006). Improved monitoring of HABs using autonomous underwater vehicles (AUV). *Harmful Algae* 5: 749-761.
 - Seliger, H.H., Carpenter, J.H., Loftus, M., Biggley, W.H., and McElroy, W.D.



ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO

SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING
INSTRUMENT (SaFA)



- (1971). Bioluminescence and phytoplankton successions in Bahía Fosforescente, Puerto Rico. *Limnol. Oceanogr.* 16: 608-622.
- Shade, A., Jones, S.E., and McMahon, K.D. (2008). The influence of habitat heterogeneity on freshwater bacterial community composition and dynamics. *Environ. Microbiol.* 10: 1057-1067.
 - Shade, A.L., Kent, A.D., Jones, S.E., Newton, R.J., Triplett, E.W., and McMahon, K.D. (2007). Inter-annual dynamics and phenology of bacterial communities in a eutrophic lake. *Limnol. Oceanogr.* 52: 487-494.
 - Smith, M.C., Steimle, G., Ivanov, S., Holly, M., and Fries, D.P. (2007). An integrated portable hand- held analyser for real-time isothermal nucleic acid amplification. *Anal. Chim. Acta.* 598: 286-294.
 - Wetzel, R.G. (2001). *Limnology: Lake and River Ecosystems*. San Diego, CA: Academic Press.
 - <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=73916&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>> Accessed 25 Aug. 2007.
 - <http://siobiolum.ucsd.edu/dino_intro.html>. Accessed 28 Aug. 2007.
 - Shamsudin, Lokman. "The Blue Green Algal Bloom in the Nearshore Waters of Cukai Bay Facing the South China Sea." *Environmental Monitoring and Assessment* Volume 59, p.123-134. 1998. Accessed 27 Aug. 2007. <<http://www.springerlink.com/content/u944125635415544/>>.
 - Dodge, J.D. "Ornamentation of thecal plates in *Protoperidinium* (Dinophyceae) as seen by scanning electron microscopy." *Journal of Plankton Research*. Volume 5. p. 119-127 Accessed 27 Aug. 2007. <<http://plankt.oxfordjournals.org/cgi/reprint/5/2/119>>.
 - <<http://www.iscid.org/encyclopedia/Amphiesma>>. Accessed 27 Aug. 2007.
 - <<http://www.ucmp.berkeley.edu/protista/dinoflagmm.html>>. Accessed 25 Aug. 2007.
 - Hansen, P., Miranda, L., Azanza, R. "Green *Noctiluca scintillans*: a dinoflagellate with its own greenhouse." *Marine Ecology Progress Series* 2004 Accessed 25 Aug. 2007. <<http://www.int-res.com/articles/meps2004/275/m275p079.pdf>>.
 - Dolah, Frances. "Marine Algal Toxins: Origins, Health Effects, and Their Increased Occurrence." 2000. Accessed 25 Aug. 2007.





ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO

SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING
INSTRUMENT (SaFA)



<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?tool=pmcentrez&artid=1637787&blobtype=pdf>>.

- Azanza, P., Azanza, R., Vargas, V., Hedreyda, C. "Bacterial Endosymbionts of *Pyrodinium bahamense* var. *compressum*." *Microbial Ecology* 2006. Accessed 25 Aug. 2007 <<http://www.springerlink.com/content/v7rgn42vk37v160x/fulltext.pdf>>.
- Camacho, F., Rodriguez, J., Marion, A., Garcia, M.C., Belarbi, E.H., Chisti, Y., Grima, E. "Biotechnological significance of toxic marine dinoflagellates" *Science Direct*. 2006. Accessed 25 Aug. 2007 <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T4X-4MG064H-2&_user=4429&_coverDate=04%2F30%2F2007&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000059602&_version=1&_urlVersion=0&_userid=4429&md5=62b280bff4013b93b373f5d3e775c352>
- <<http://www.ucmp.berkeley.edu/protista/dinoflaglh.html>> Accessed 26 Aug. 2007.
- Soli, Giorgio. "Bioluminescent Cycle of Photosynthetic Dinoflagellates." *Limnology and Oceanography*, Vol. 11, No. 3. (Jul., 1966), pp. 355-363. Accessed 29 Aug. 2007 <<http://www.jstor.org/view/00243590/dm994849/99p03815/0>>.
- Latz, Michael. "Predicting Bioluminescence Signatures Based on the NAVOCEANO Bioluminescence Database." Accessed 25 Aug. 2007 <http://www.onr.navy.mil/sci_tech/32/reports/docs/05/oblatz.pdf>.
- Latz, Michael. Personal communication. 2007.
- Gasparich, Sara. "The Concentration and Distribution of Bioluminescent Dinoflagellates in Vieques, Puerto Rico." *20th Annual Keck Symposium*. 2007. Accessed 29 Aug. 2007 <http://keck.wooster.edu/publications/2007_abstracts/final%20pdfs/Gasparich.pdf>.
- Biggley, W.H., Swift, E., Buchanan, R.J., Seliger, H.H. "Stimulable and Spontaneous Bioluminescence in the Marine Dinoflagellates, *Pyrodinium bahamense*, *Gonyaulax polyedra*, and *Pyrocystis lunula*." Accessed 24 Aug. 2007. <www.jgp.org>.
- Seliger, H.H., Carpenter, J.H., Loftus, M., McElroy, W.D. "Mechanisms for the Accumulation of High Concentrations of Dinoflagellates in a Bioluminescent Bay." *Limnology and Oceanography*, Vol.15, No. 2. 1970. p 234-245. Accessed 24 Aug.

	ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO	
	SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)	

2007. <www.jstor.org>.

- Saldarriaga, J., Taylor, F.J.R., Keeling, P., Cavalier-Smith, T. “Dinoflagellate Nuclear SSU rRNA Phylogeny Suggests Multiple Plastid Losses and Replacements” 2000 Accessed 24 Aug. 2007. <<http://www.springerlink.com/content/yfmxdcyay829248c/>>.
- <<http://www.ucmp.berkeley.edu/protista/dinoflaglh.html>>. Accessed 24 Aug. 2007.
- Sarjeant, W., Lacalli, T., Gaines, G.. “The cysts and skeletal elements of dinoflagellates: speculations on the ecological causes for their morphology and development”. Accessed 24 Aug. 2007. <www.jstor.org>.



ANEXOS

1 CÁLCULO

1.1 CÁLCULO FUERZAS BOYANTES

La pérdida de peso de un cuerpo sumergido es igual al peso del fluido desplazado por el cuerpo, por lo tanto, tenemos que la fuerza boyante, que tiene la misma dirección que la gravedad pero sentido contrario, tiene un valor igual al resultado de la siguiente fórmula.

$$F_b = \rho_{sw} \cdot V$$

Densidad del agua: 64,3 lbf / ft³

Diámetro exterior de la carcasa: 8,625 in

Longitud de la carcasa: 39,5 in

Volumen del recipiente: $\pi * D^2/4 * L = 3,14 * 8,625^2 * 39,5 = 6536,4 \text{ in}^3 = 3,78 \text{ ft}^3$

$$F_b = 64.3 \frac{\text{lbf}}{\text{ft}^3} \cdot 3.78 \text{ ft}^3 = 243 \text{ lbf}$$

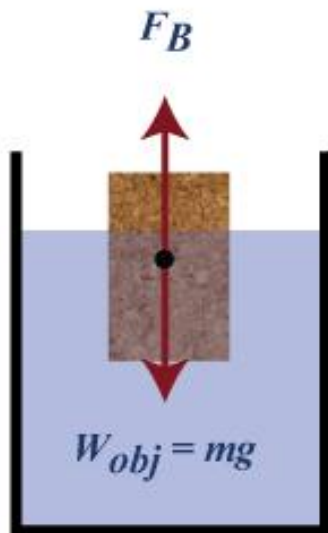


Figura 49.
Fuerzas
boyantes.

Por tanto, para que el artefacto se pueda sumergir, la masa del mismo debería ser mayor a la fuerza boyante provocado por el mismo.

$$F_b > W_{obj} = m * g$$

$$F_b > 243 \text{ lb}$$



ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO

SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING
INSTRUMENT (SaFA)



1.2 CÁLCULO CONSUMOS ELÉCTRICOS

Consumo de PLC:

30 mA de consumo a 24 Vdc durante 72 h

$$30 \text{ mA} * 24 \text{ Vdc} = 0,72 \text{ W}$$

$$72 \text{ h} * 0,72 \text{ W} = 51,84 \text{ W*h} \approx 52 \text{ W*h}$$

Consumo de las válvulas:

62,5 mA de consumo a 24 Vdc durante las conmutaciones

$$62,5 \text{ mA} * 24 \text{ Vdc} = 1,5 \text{ W}$$

24 filtros * 3 succiones/filtro = 72 succiones por inmersión

1 min/succión * 72 succiones / 60 min/h = 1,2 h de funcionamiento por inmersión

$$1,5 \text{ W} * 1,2 \text{ h} = 1,8 \text{ W*h}$$

$$1,8 \text{ W*h} * 4 \text{ válvulas} = 7,2 \text{ W*h} \approx 8 \text{ W*h}$$



Consumo de la válvula rotativa:

Durante el giro:

$$2,5 \text{ A} * 24 \text{ Vdc} = 60 \text{ W}$$

0,166 s/posición * 24 posiciones / 60 min/h = 0,0664 h

$$60 \text{ W} * 0,0664 \text{ h} = 3,984 \text{ W*h}$$

	<p>ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO</p>	
	<p>SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)</p>	

En standby:

$$0,1 \text{ A} * 24 \text{ Vdc} = 2,4 \text{ W}$$

$$72 \text{ h} * 2,4 \text{ W} = 172,8 \text{ W*h}$$

Total consumo:

$$3,984 \text{ W*h} + 172 \text{ W*h} \approx 174 \text{ W*h}$$

Con los elementos calculados hasta ahora tenemos un consumo total de:



$$174 \text{ W*h} + 8 \text{ W*h} + 52 \text{ W*h} = 234 \text{ W*h}$$

Las baterías elegidas aportan:

$$206 \text{ W*h/batería} * 2 \text{ baterías} = 412 \text{ W*h}$$

Nos quedan disponibles para la jeringa:

$$412 \text{ W*h} - 234 \text{ W*h} = 178 \text{ W*h}$$

	ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO	
	SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)	

2 PLANOS

ÍNDICE DE PLANOS

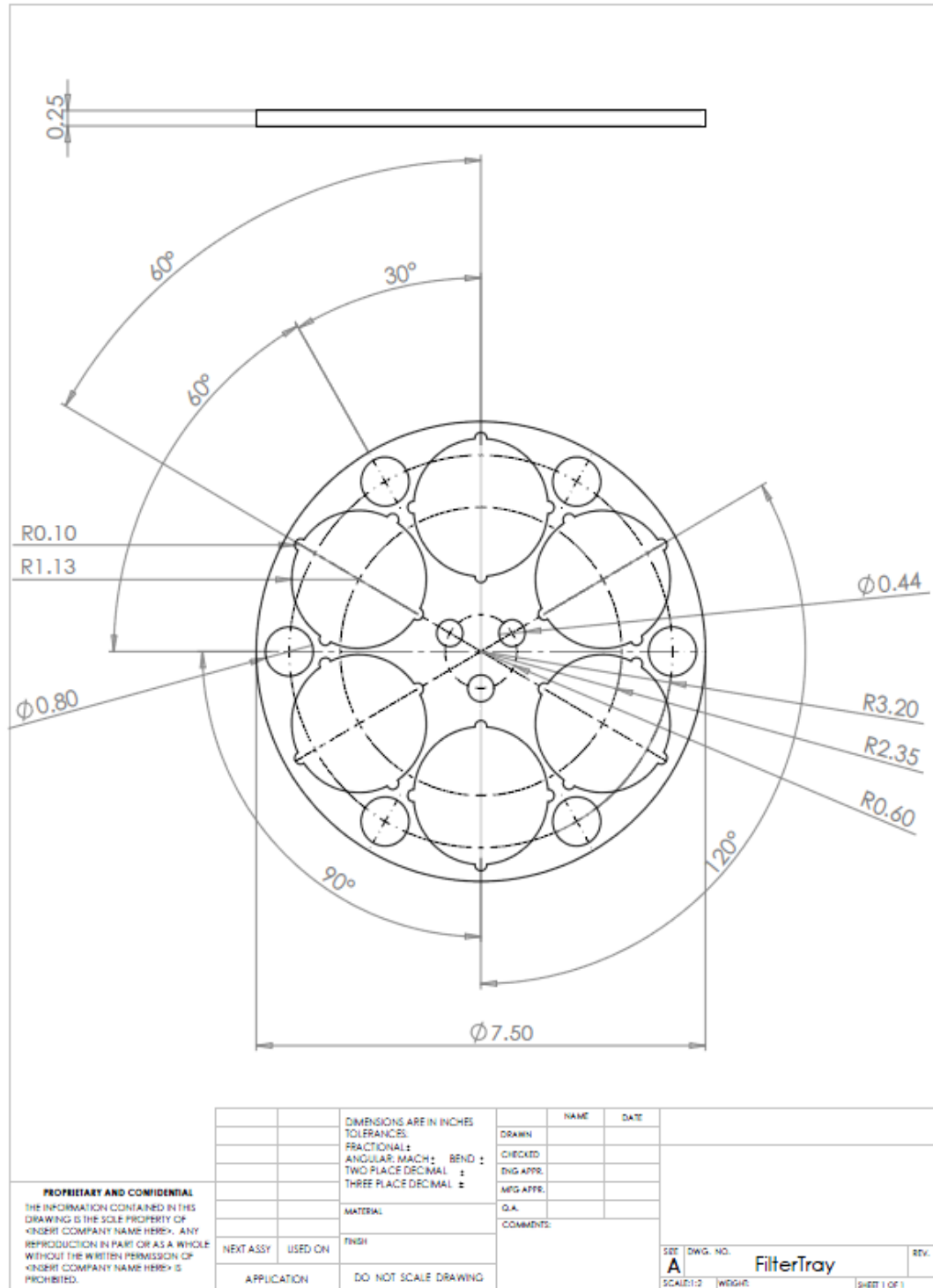
Los dos primeros planos representan las bandejas que portan los filtros, el resto, representan la configuración del sistema según el estado del ciclo en el que se encuentra.

1. FILTER TRAY	31
2. BOTTOM FILTER TRAY	32
3. SAFA WATER RINSE	33
4. PRE-DEPLOY	34
5. WATER RINSE	35
6. WATER FILTER	36
7. BUFFER ADDITION 1	37
8. BUFFER ADDITION 2	38



ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO

SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)

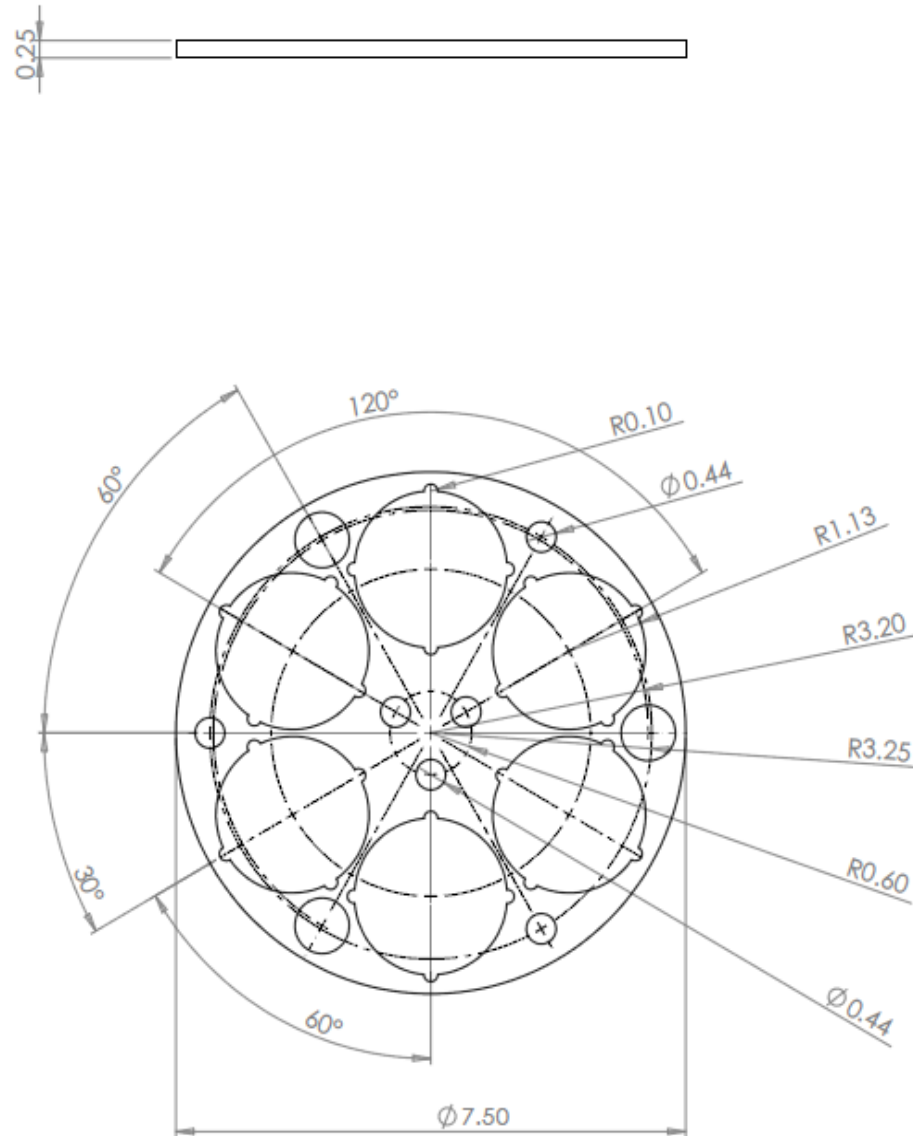




ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO



SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING
INSTRUMENT (SaFA)



PROPRIETARY AND CONFIDENTIAL
THE INFORMATION CONTAINED IN THIS
DRAWING IS THE SOLE PROPERTY OF
<INSERT COMPANY NAME HERE>. ANY
REPRODUCTION IN PART OR AS A WHOLE
WITHOUT THE WRITTEN PERMISSION OF
<INSERT COMPANY NAME HERE> IS
PROHIBITED.

DIMENSIONS ARE IN INCHES TOLERANCES: FRACTIONAL ± ANGULAR, MATCH ± BEND ± TWO PLACE DECIMAL ± THREE PLACE DECIMAL ±	
MATERIAL	
NEXT ASSY	USED ON
FINISH	
APPLICATION	
DO NOT SCALE DRAWING	

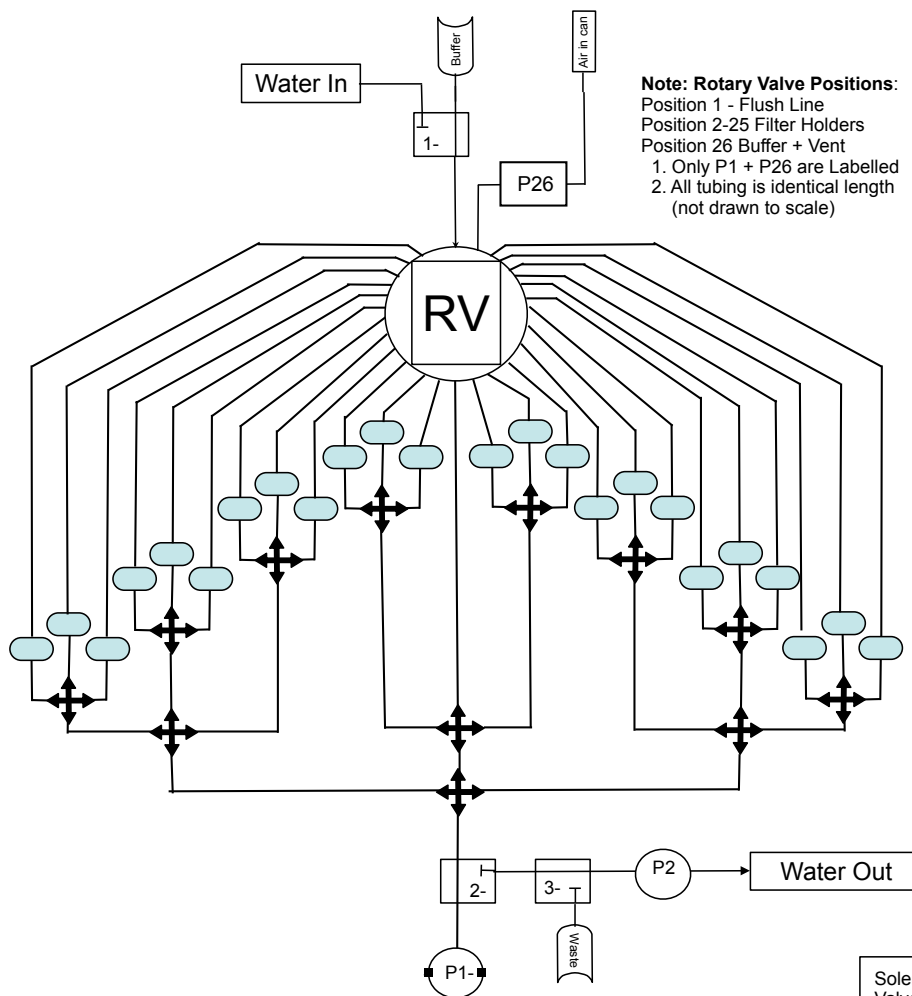
NAME	DATE
DRAWN	
CHECKED	
ENG APPR.	
MFG APPR.	
Q.A.	
COMMENTS:	

SET: DWG. NO. **A** BottomFilterTray REV.
SCALE: 1:2 WEIGHT: SHEET 1 OF 1



ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO

SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)



Note: Pump 2 (P2): A small pump here e.g., a windscreen washer pump might have to be added to clear the lines. Can be operated like a solenoid valve by applying voltage to turn on/off.

Sample Filtration and Archiving Instrument	
Title: SaFA Water Rinse	Date
Prepared By: Matthew Smith	14/Feb/2011
Replaces:	
Comments:	

Solenoid Valve "x"	
Rotary Valve	
Syringe Pump	
Possible 2nd Pump	
4-way Connector	
Filter Holder	

Monday, 14 February 2011



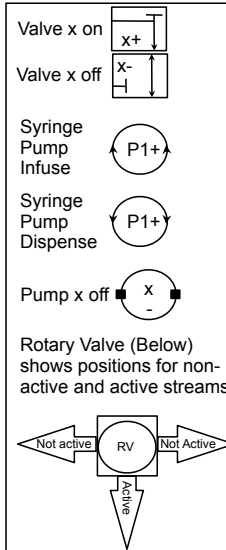
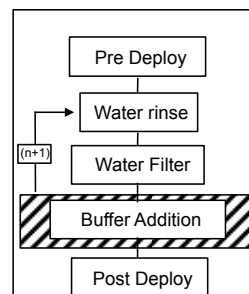
ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO



SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)

SaFA Water Sample Process Flow

Name: Pre-Deploy
Purpose: Not required at this point



Sample Filtration and Archiving Instrument	
Title: SaFA Water Rinse	Date
Prepared By: Matthew Smith	14/Feb/2011
Replaces:	
Comments:	

Monday, 14 February 2011



ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO

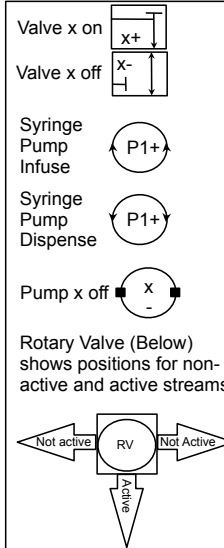
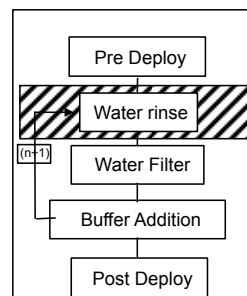
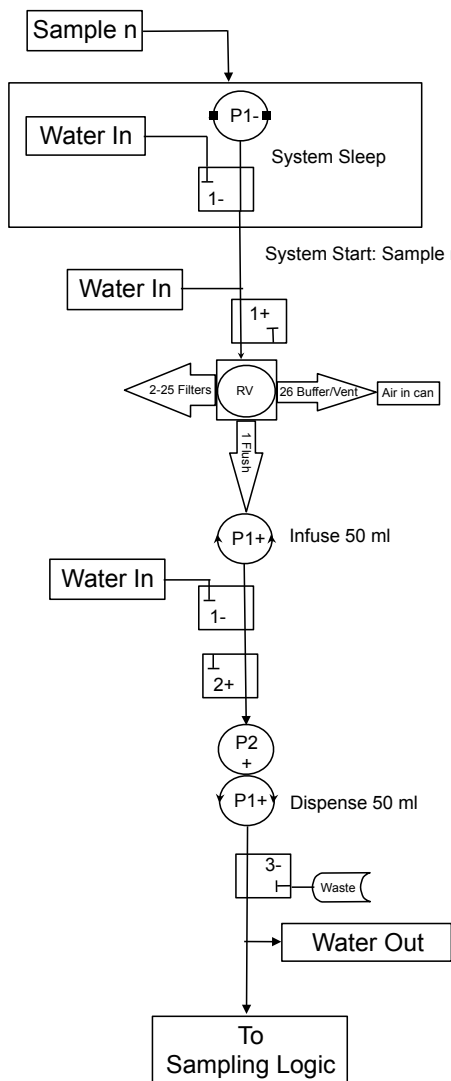
SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)



SaFA Water Sample Process Flow

Name: Water Rinse

Purpose: Flush the system with ambient water prior to filtration



Event	State	Action
1	Valve 1 On	Opens water inlet to pump
2	Rotary Selected to Stream1	By passes filters to flush system
3	Syringe (P1) On Infuse mode	Pull water in (50 ml)
4	Valve 1 Off	Closes seawater inlet
5	Valve 2 On	Opens pump to water outlet
6	Pump 2 On	Helps push water out to sea
6	Syringe (P1) On: Dispense mode	Pushes 50 ml out to sea
7	Go To Sampling Logic	Start filtration of Water

Sample Filtration and Archiving Instrument	Date	14/Feb/2011
	Title: SaFA Water Rinse	
	Prepared By: Matthew Smith	
	Replaces: Comments:	

Monday, 14 February 2011



ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO

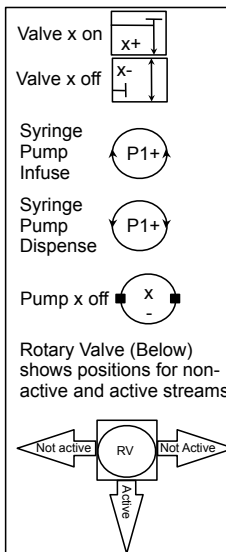
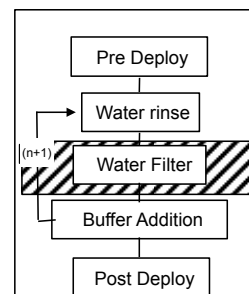
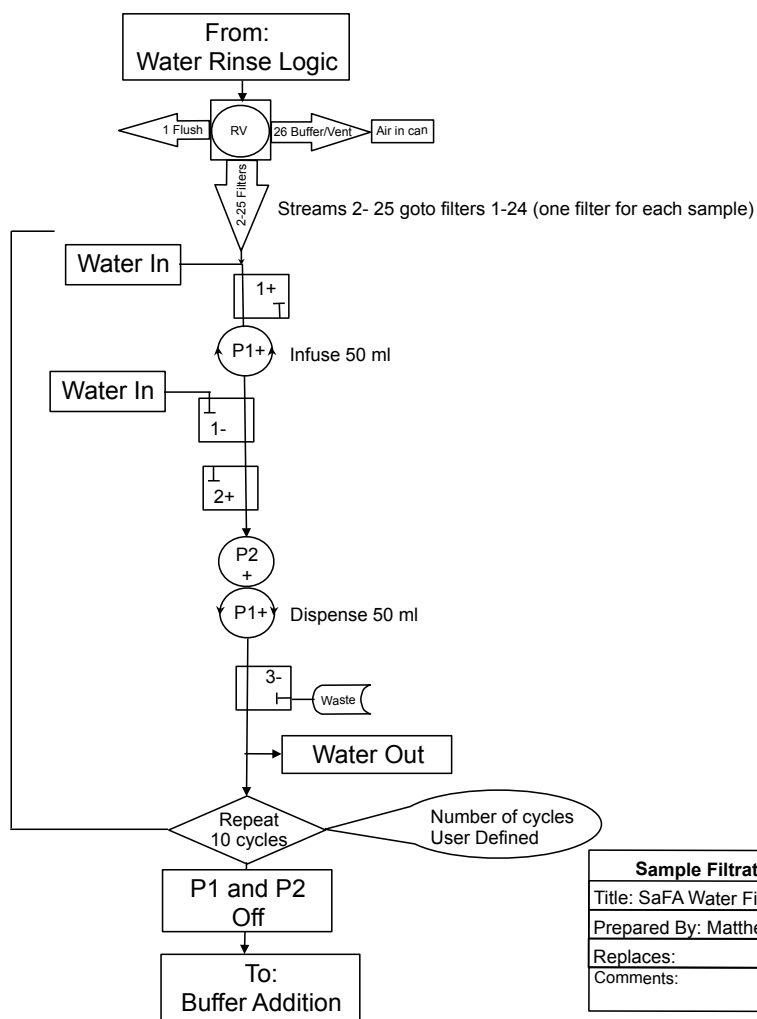
SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)



SaFA Water Sample Process Flow

Name: Water Filter

Purpose: Pulls water through filters



Sample Filtration and Archiving Instrument

Title: SaFA Water Filter	Date
Prepared By: Matthew Smith	14/Feb/2011
Replaces:	
Comments:	

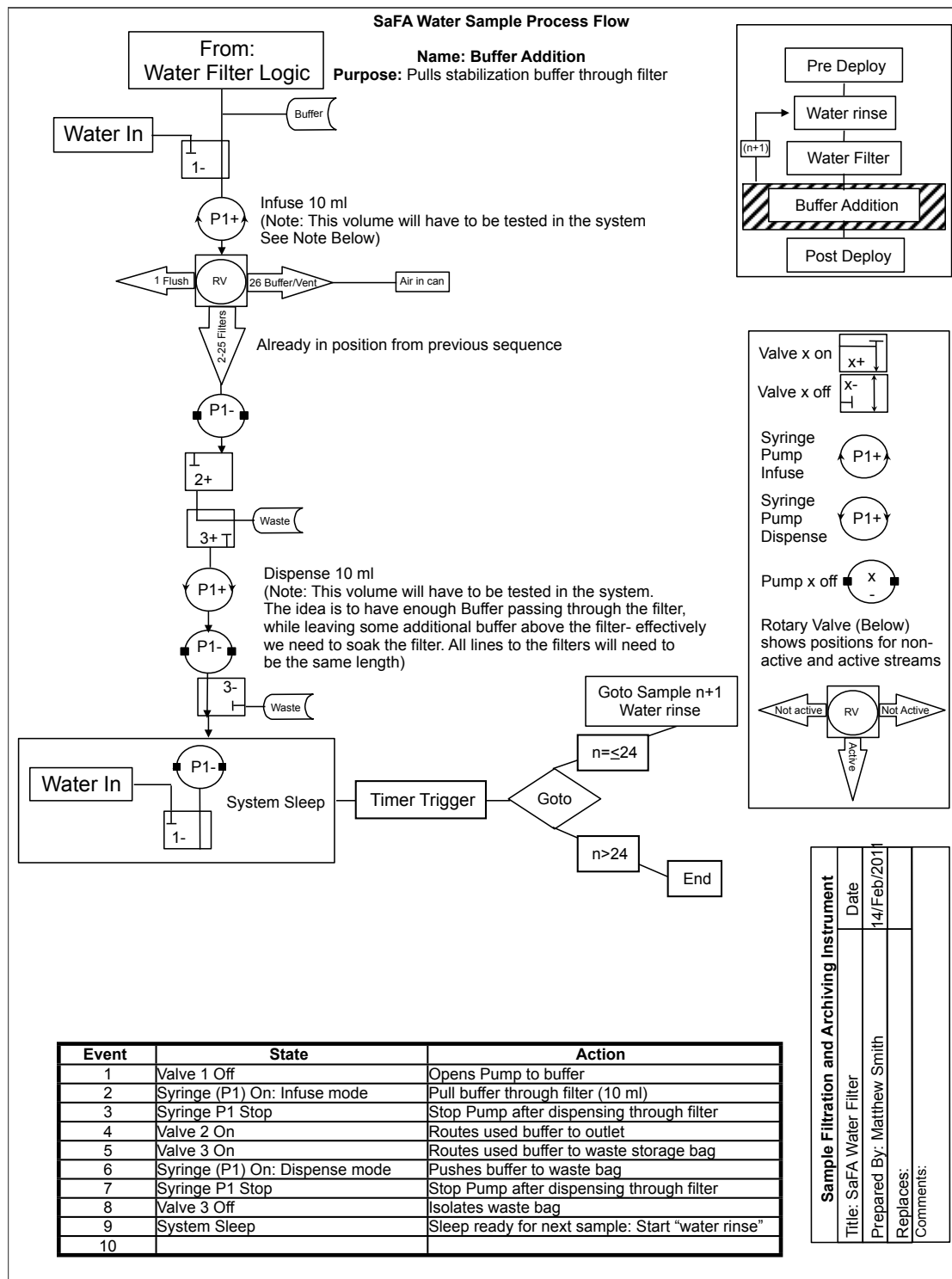
Event	State	Action
1	Rotary Valve Advance Position (1+n)	Positions rotary valve to filter
2	Valve 1 On	Opens Inlet to pump
3	Syringe (P1) On Infuse mode	Pull water in (50 ml)
4	Valve 1 Off	Closes Pump environment
5	Valve 2 On	Opens pump to water outlet
6	Pump 2 P2 On	Helps push water out to environment
7	Syringe (P1) On: Dispense mode	Pushes 50 ml water out to environment
8	Repeat user defined cycles	Samples x ml Water
9	Advance to Buffer Addition	

Monday, 14 February 2011

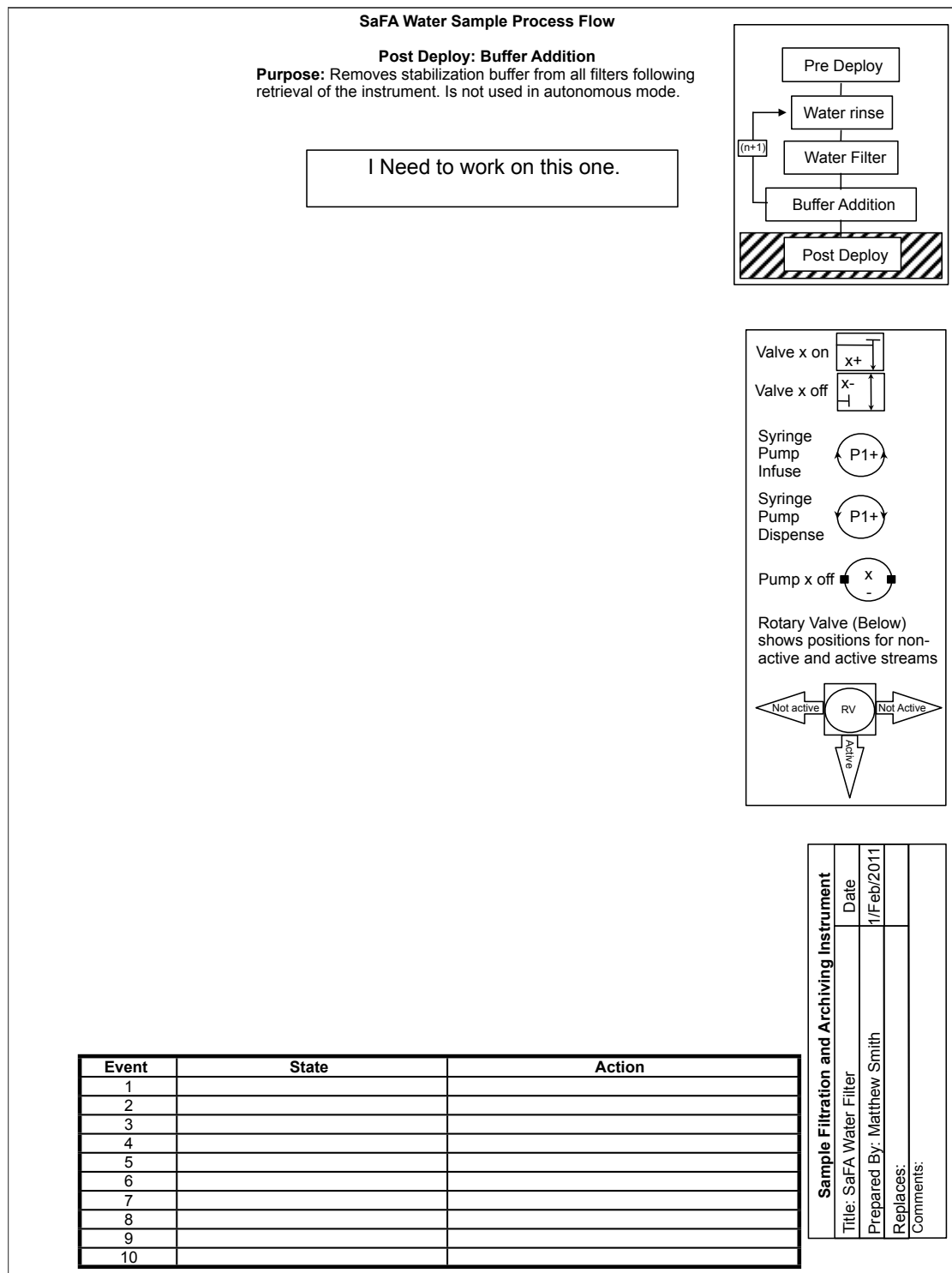


ÁNGEL GÓMEZ VALLEJO

SAMPLE FILTRATION AND ARCHIVING INSTRUMENT (SaFA)



Monday, 14 February 2011



Monday, 14 February 2011